

01672



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

6<sup>2ej.</sup>

**ESTUDIO DE LA PATOGENIA DEL VIRUS DE INFLUENZA  
AVIAR (H5N2) ALTAMENTE PATOGENO MEDIANTE  
INMUNOHISTOQUIMICA.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:**

**AVES**

**P R E S E N T A D A P O R :**

**ALEJANDRO HERNANDEZ MAGDALENO**

**DIRECTORES DE TESIS: MVZ. Ph.D. JUAN GARCIA GARCIA.  
MVZ. MC. MARIA TERESA CASAUBON HUGUENIN.**



**MEXICO, D. F.**

263118

1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La tesis es el resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indique lo contrario, dándose reconocimiento a las fuentes de información consultadas. El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio académico.

MVZ ALEJANDRO HERNANDEZ MAGDALENO

## DEDICATORIAS

A todas aquellas personas que de alguna manera han participado en mi formación y a quién  
no menciono para no olvidar a alguien

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme formado.

Al Proyecto Estrategias para el Control y Erradicación de la Influenza Aviar de México, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria, en donde se realizó ésta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para la realización de mis estudios de posgrado.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por haberme otorgado el premio de apoyo a la investigación para alumnos de posgrado.

A mis directores de tesis, MVZ Ph.D. Juan García García y MVZ MC Maria Teresa Casaubon Huguenin.

A la MVZ MC Maria Teresa Casaubon Huguenin, por haberme tenido paciencia y dedicar tantas horas de su tiempo ayudandome en el estudio de la patogenia de la enfermedad.

A los miembros del Jurado: Dr. Guillermo Téllez Isalás, Dr. Fernando Constantino Casas, Dr. Tamas Fehervari, Dr. Juan García García y Dr. Alejandro Banda Castro, por sus valiosos consejos.

Al Dr. David E. Swayne, United States Department of agriculture, Agricultural Research Service, Southeast Poultry Research Laboratory, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y haber donado el material necesario para la inmunohistoquímica.

A mis compañeros de la maestría y a mis compañeros de trabajo, sin quienes no hubiera sido posible la toma de muestras de ésta tesis.

## RESUMEN

HERNANDEZ MAGDALENO ALEJANDRO: ESTUDIO DE LA PATOGENIA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (H5N2) ALTAMENTE PATOGENO MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA. Asesorado por: MVZ Ph.D. Juan García García y MVZ MC. Maria Teresa Casaubon Huguenin.

El objetivo de la presente investigación fue estudiar la patogenia del virus de influenza aviar (H5N2) altamente patógeno en aves susceptibles (Av-Susc) y aves inmunizadas (Av-Inm), durante las primeras 72 horas post-inoculación (hpi) a través de inmunohistoquímica. Se formaron dos grupos de 100 aves libres de patógenos específicos cada uno. A los 8 días de edad, uno de los grupos fue inmunizado con una vacuna emulsionada contra influenza aviar (IA) y el otro grupo permaneció sin inmunizar. A las cuatro semanas de edad, ambos grupos de aves fueron inoculados vía intranasal con  $1 \times 10^3$  DLEP<sub>50</sub> del virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Se tomaron aleatoriamente 3 aves de cada grupo a las 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 hpi. De cada ave se tomó una muestra de sangre para aislamiento y titulación viral; posteriormente, fueron sacrificadas humanitariamente y se tomaron muestras para histopatología e inmunohistoquímica de cresta, timo, cornetes nasales, laringe, tráquea, pulmón, proventrículo, duodeno, páncreas, tonsilas cecales, ileon y bolsa de Fabricio. Se realizaron seis diferentes procedimientos de la técnica de inmunohistoquímica. Al examen microscópico, las lesiones fueron calificadas con un método numérico para calcular la media histológica de lesiones (MHL). Las Av-Susc mostraron signos clínicos, mortalidad y fue detectado virus circulante en sangre a partir de las 28 hpi. En las Av-Inm, a pesar de que hubo lesiones a nivel microscópico, fueron generalmente menos severas que en las Av-Susc, incluso en la cresta no se observaron lesiones, a diferencia de las Av-Susc, donde fue el tejido más afectado tal como se reflejó en la MHL. Las diferencias en la manifestación de la enfermedad entre ambos grupos fueron marcadas y a pesar de que no se pudo demostrar mediante inmunohistoquímica la presencia del virus en los tejidos, en las Av-Susc hubo viremia, situación que no sucedió en las Av-Inm. En las Av-Susc el daño al endotelio capilar producido por el virus pudo ser uno de los mecanismos responsables de la muerte de los animales al desencadenar un colapso vascular generalizado. Así mismo, el virus de AP produjo apoptosis linfocítica severa. La inmunidad conferida por la vacuna emulsionada contra IA, protegió a las aves de la presentación de signos clínicos y mortalidad, debido a que evitó la viremia, con lo que el virus no pudo causar daño en centros vitales del ave.

Palabras claves: Influenza Aviar, patogenia, inmunohistoquímica, inmunidad, viremia, apoptosis.

## SUMMARY

HERNANDEZ MAGDALENO ALEJANDRO : A PATHOGENESIS STUDY OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N2), USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY. Advised by MVZ Ph.D. Juan García García and MVZ MC Maria Teresa Casaubon Huguenin.

The purpose of this work was to study the pathogenesis of highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) on susceptible (Av-Susc) and immunized (Av-Imm) chickens, during the first seventy-two hours post-inoculation (hpi). Two hundred specific pathogen-free chickens were divided into two groups. At eight days of age, one group was immunized with an inactivated oil emulsion vaccine. At four weeks of age, both groups were intra-nasally inoculated with  $1 \times 10^3$  median embryo infective doses of highly pathogenic avian influenza virus. The virus used was A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2). Three birds from each group were taken at two hours, then at four hour intervals from four to seventy-two hpi. From each bird a blood sample was taken to isolate the virus. The chickens were then sacrificed. Samples of comb, thymus, nasal cavity, larynx, trachea, lung, proventriculus, duodenum, pancreas, cecal tonsil, jejunum and cloacal bursa were collected for histological and immunohistochemistry evaluation. Six different methods for immunohistochemistry staining were performed. With microscope examination, the lesions were classified with a numeric system to calculate their mean histologic lesion score (MHL). The Av-Susc shown clinical signs, mortality, and detectable virus in the blood after 28 hpi. In the Av-Imm, under microscopic examination, lesions were generally less severe than in Av-Susc, including no observed lesions in the comb samples of Av-Imm, whereas in Av-Susc, this area was greatly affected, as reflected in the MHL. The differences in the manifestation of the disease between both groups were marked. The virus could not be demonstrated in the tissue of any birds by immunohistochemistry, however, Av-Susc had viremia, which was not the case in the Av-Imm. In the Av-Susc, lesions in the capillary endothelium produced by the virus could have been one of the mechanisms responsible for mortality in the animals. As well, the highly pathogenic virus produced severe apoptosis. The immunity conferred by the emulsion vaccine against AI, protected the Av-Imm from the presentation of clinical signs and mortality and prevented viremia.

Key Words: Avian Influenza, pathogenesis, immunohistochemistry, immunity, viremia, apoptosis

## CONTENIDO

	Página
DECLARACION	i
DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	10
1.3 Hipótesis	10
1.4 Objetivo	11
1.4.1 Objetivos específicos	11
2.- MATERIAL Y METODOS	12
2.1 Lugar	12
2.2 Animales de experimentación y alojamiento	12
2.3 Diseño experimental	12
2.4 Vacunación	12
2.5 Serología	13
2.6 Inoculación con una cepa altamente patógena de Influenza Aviar	13
2.7 Colección de sangre para aislamiento viral y muestras de tejidos para histopatología e inmunohistoquímica	13
2.8 Técnica de inmunohistoquímica para localización de nucleoproteína	14
2.8.1 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos monoclonales	14
2.8.2 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos policlonales producidos en cabra	14
2.8.3 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos policlonales producidos en pollo	15
2.8.4 Sistema de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina	15
2.8.5 Sistema de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina con anticuerpos policlonales producidos en conejo	15



2.8.6 Sistema de detección de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina con anticuerpos monoclonales y policlonales producidos en conejo	16
2.9 Calificación de lesiones	16
2.10 Aislamiento e identificación viral	17
2.11 Titulación viral	17
3.- RESULTADOS	18
3.1 Respuesta a la vacunación	18
3.2 Signos clínicos post-inoculación	18
3.3 Mortalidad post-inoculación	18
3.4 Hallazgos a la necropsia	18
3.5 Hallazgos histopatológicos	19
3.5.1 Cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales	19
3.5.2 Laringe	20
3.5.3 Tráquea	20
3.5.4 Pulmón	20
3.5.5 Proventrículo	21
3.5.6 Duodeno	21
3.5.7 Páncreas	22
3.5.8 Ileon	22
3.5.9 Timo	22
3.5.10 Tonsilas cecales	23
3.5.11 Bolsa de Fabricio	23
3.5.12 Cresta	23
3.6 Inmunohistoquímica	24
3.7 Aislamiento e identificación viral	24
4.- DISCUSION	25
5.- LITERATURA CITADA	33

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.-** Medias geométricas de los títulos de anticuerpos y porcentaje de seroconversión de aves inmunizadas con una vacuna inactivada contra influenza aviar.

**Cuadro 2.-** Porcentajes de aves con lesiones en los cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 3.-** Porcentajes de aves con lesiones en la laringe después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 4.-** Porcentajes de aves con lesiones en la tráquea después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 5.-** Porcentajes de aves con lesiones en los pulmones después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 6.-** Porcentajes de aves con lesiones en el proventrículo después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 7.-** Porcentajes de aves con lesiones en el duodeno después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 8.-** Porcentajes de aves con lesiones en el páncreas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 9.-** Porcentajes de aves con lesiones en el íleon después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 10.-** Porcentajes de aves con lesiones en el timo después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 11.-** Porcentajes de aves con lesiones en las tonsilas cecales después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 12.-** Porcentajes de aves con lesiones en la bolsa de Fabricio después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Cuadro 13.- Porcentajes de aves con lesiones en la cresta después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.-** Media histológica de lesiones en los cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 2.-** Media histológica de lesiones en la laringe de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 3.-** Media histológica de lesiones en la tráquea de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 4.-** Media histológica de lesiones en el pulmón de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 5.-** Media histológica de lesiones en el proventrículo de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 6.-** Media histológica de lesiones en el duodeno de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 7.-** Media histológica de lesiones en el páncreas de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 8.-** Media histológica de lesiones en el ileon de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 9.-** Media histológica de lesiones en el timo de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 10.-** Media histológica de lesiones en las tonsilas cecales de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 11.-** Media histológica de lesiones en la bolsa de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 12.-** Media histológica de lesiones en la cresta de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 13.-** Comportamiento de los títulos virales circulantes en la sangre de aves susceptibles después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 14.-** Cantidad de virus de influenza aviar circulante en la sangre de aves susceptibles después de la infección con el virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Figura 15.-** Glándulas salivales palatinas de un ave susceptible 72 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Adenitis no supurativa severa con destrucción del parénquima glandular (flechas). H&E. 80X

**Figura 16.-** Glándulas salivales palatinas de un ave susceptible 72 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Adenitis no supurativa severa con abundante infiltración linfocitaria (flechas). H&E. 180X

**Figura 17.-** Timo de un ave susceptible 56 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Apoptosis severa en zona cortical (flechas pequeñas). Depresión linfocitaria severa en zona medular (flecha grande). H&E. 80X

**Figura 18.-** Timo de un ave susceptible 56 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Apoptosis severa en zona cortical (flechas pequeñas). Apoptosis y depresión linfocitaria severa en zona medular (flecha grande). H&E. 180X

**Figura 19.-** Cresta de un ave susceptible 36 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Focos de necrosis y vacuolización del epitelio en epidermis (flecha grande). Presencia de exudado seroso y leucocitos en dermis (flechas chicas). H&E. 80X

**Figura 20.-** Cresta de un ave susceptible 36 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Arteriola sin cambios (flecha chica). Arteriola con formación de un trombo rodeada de exudado seroso y leucocitos del proceso inflamatorio (flecha grande). H&E. 720X

## LISTA DE ABREVIATURAS

IA	influenza aviar
AP	alta patogenicidad
Arg	arginina
Av-Inm	aves inmunizadas
Av-Susc	aves susceptibles
BP	baja patogenicidad
CENID-Microbiología	Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria
DLEP <sub>50</sub>	dosis letales para el embrión de pollo al 50%
DLP <sub>50</sub>	dosis letales pollo al 50%
DNA	ácido desoxirribonucleico
Gli	glicina
H&E	hematoxilina-eosina
H1-H15	subtipos de hemoaglutinina
HA	hemoaglutinina
HA0	hemoaglutinina no dividida
HA1	hemoaglutinina subunidad 1
HA2	hemoaglutinina subunidad 2
hpi	horas post-inoculación
IH	inhibición de la hemoaglutinación
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Lis	liscina
N1-N9	subtipos de neuroaminidasa
NA	neuroaminidasa
NP	nucleoproteína
PD	post-desafío
Pro	prolina
PV	post-vacunación
RNA	ácido ribonucleico
SCPS	sin cambios patológicos significativos
Tre	treonina
UH	unidades hemoaglutinantes

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1 Antecedentes

La influenza aviar (IA) es una enfermedad causada por virus de influenza A, el cual pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* (Seen *et al.* 1996). Varios subtipos antigénicos del virus han sido recuperados de muchas especies aviares silvestres y domésticas en todo el mundo (Easterday y Hinshaw 1991). Las infecciones en las aves domésticas o confinadas han estado generalmente asociadas a una variedad de manifestaciones clínicas y varían desde infecciones leves del tracto respiratorio y fallas reproductivas que causan baja en la producción de huevo hasta manifestaciones generalizadas que ocasionan la muerte (Murphy y Webster 1990). En las aves silvestres la infección generalmente no está asociada a signos clínicos y la única pérdida ecológica, específicamente atribuible a la infección por el virus de la influenza, ha sido la muerte de varios cientos de golondrinas de mar en Sudafrica en 1961, causada por la cepa A/Tern/South Africa/1/61 (H5N3) (Estudillo, 1996; Webster *et al.* 1992). Durante este siglo la mortalidad en aves silvestres había sido atribuida a la Peste Aviar en varias ocasiones. En 1955 se demostró que esta es causada por virus de la influenza A (Easterday y Hinshaw 1991).

Influenza es el modelo de una enfermedad viral en la cual, la mutación continua del virus es de gran importancia para las epidemias anuales y las ocasionales pandemias de la enfermedad en humanos. Los virus de influenza A infectan a una gran cantidad de animales, incluyendo humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y aves (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992). Se ha demostrado que las aves acuáticas son las fuentes de virus de influenza para otras especies (Slemons *et al.* 1990). Recientes estudios filogenéticos han revelado linajes específicos de genes virales asociados a la infección de algunas especies y han demostrado que la transmisión interespecies depende de la susceptibilidad genética de las mismas (Easterday y Hinshaw 1991, Webster *et al.* 1992).

Un muestreo intensivo en 1974, de aves migratorias y costeras durante un brote de la enfermedad de Newcastle en aves domésticas en California, demostró que muchos virus de influenza A pueden ser aislados de las aves migratorias clínicamente sanas (Slemons *et al.* 1974). Subsecuentemente, los virus de influenza fueron aislados de aves silvestres, aves en jaula, patos domésticos, gallinas y pavos. Slemons y colaboradores en 1990, evaluaron la virulencia de 76 cepas de virus de influenza A aisladas de aves acuáticas en los estados de Wisconsin, California, Dakota del Sur, Florida, Texas, Alabama y Nebraska, encontrando que dentro de los virus de influenza A circulantes en las poblaciones de patos, existen cepas potencialmente patógenas para los pollos.



Los virus de influenza A son miembros de la familia *Orthomyxoviridae*. El género A se diferencia de los géneros B y C con base en la identidad de los antígenos mayores internos (Harley *et al.* 1990). En el aislamiento inicial, los virus de influenza A son pequeños (80 a 120 nm de diámetro), partículas pleomórficas que más tarde son esféricas. Estas partículas consisten en una envoltura lipídica de dos capas derivadas de la célula hospedadora, en la cual se embeben las glicoproteínas codificadas por el virus, hemoaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). El genoma de los virus de influenza A consiste en ocho segmentos de RNA, seis de los cuales son monocistrónicos y dos codifican para la síntesis de dos proteínas cada uno. Los ocho segmentos codifican 10 productos reconocidos: las polimerasas PB1, PB2 y PA, las proteínas HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NS2 (Kingsburry 1990, Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992).

La polimerasa PB1 es codificada por el segmento 2 del RNA, funcionando en el complejo RNA polimerasa como proteína responsable de la elongación del RNA mensajero viral. La polimerasa PB2 es codificada por el segmento 1 del RNA y desempeña su papel en la síntesis del molde completo del RNA viral con sentido negativo. La polimerasa PA es codificada por el segmento 3 del RNA y existe evidencia de su posible rol como proteína quinasa o como proteína desenvolvedora (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992).

La HA es una proteína integrada a la envoltura, es el principal antígeno de la superficie del virión y es responsable de la unión de los viriones al receptor celular (Rott 1992, Perdue *et al.* 1996). La HA se codifica en el segmento 4 del RNA viral (Kingsburry 1990, Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992). El paso final del procesamiento es la división de la HA en dos subunidades, HA1 y HA2, conectadas por puentes de disulfuro; la HA no dividida se denomina HA0. Actualmente en la naturaleza, hay reconocidos 15 subtipos de HA (de H1 a H15), los cuales difieren en al menos 30% en la secuencia de aminoácidos de H1 y no muestran reactividad serológica cruzada.

Debido a la propensión al error de la actividad de la RNA polimerasa, la HA del virus de influenza está sujeta a una tasa muy alta de mutación, estimada de  $2 \times 10^{-3}$  sustituciones de base por posición por generación viral, o como una sustitución de base en el gen HA por generación. La selección para la sustitución de aminoácidos es mediada al menos en parte, por la presión inmune, ya que la HA es el blanco principal de la respuesta inmune del hospedero. Aunque los aminoácidos en el sitio de recepción-unión, así como la cistina y la mayoría de los residuos de prolina, son altamente conservados, el resto de la molécula de HA es altamente mutable (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992).

Dos grupos de virus de influenza han sido aislados de aves domésticas. El primer grupo de virus, incluye los subtipos H5 y H7 que pueden ser altamente patógenos (AP) y causar del 75 al 100% de mortalidad. El segundo grupo de virus de baja patogenicidad (BP) con los otros subtipos de HA y NA, pueden causar o no mortalidad en infecciones experimentales. El determinante mayor de la diferencia en virulencia entre los dos grupos de virus es la susceptibilidad de la HA a la acción de las proteasas celulares que la dividen en HA1 y HA2 (Rott, 1992, Alexander *et al.* 1996, Perdue *et al.* 1996). La HA es la proteína responsable de la unión del virus a las células que contienen ácido siálico, que actúa como sitio receptor. También, se involucra en la fusión de la envoltura viral a las membranas celulares a través de un segundo receptor hipotético, formando un puente entre la membrana y la envoltura viral, lo que permite la penetración de la nucleocápside a la célula (Connor *et al.* 1994). Para que este mecanismo se lleve a cabo, es necesario que la molécula de HA sea dividida por acción enzimática en HA1 y HA2 (Rott, 1992).

La nucleoproteína (NP) se codifica en el segmento 5 del RNA. La proteína es transportada al núcleo de las células infectadas donde se une y encierra al RNA viral. La neuroaminidasa (NA), codificada por el segmento 6 del RNA viral, es también una glicoproteína integrada a la envoltura y el segundo antígeno mayor de la superficie del virión. Su función es la de liberar las partículas virales de los receptores celulares del hospedero, permitiendo que la progenie viral escape de la célula que los originó y en consecuencia, facilitar la diseminación del virus (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992). Nueve subtipos de NA (de N1 a N9) han sido identificados en la naturaleza, careciendo de reactividad serológica cruzada.

La mezcla genética de los virus de influenza A en las aves acuáticas provee toda la diversidad requerida para que se generen virus de influenza que pueden llegar a ser pandémicos para humanos, otros animales y aves (Easterday y Hinshaw 1991). En humanos, cerdos y caballos, los virus de influenza A se encuentran en evolución constante. En aves acuáticas silvestres, los virus de influenza parecen estar completamente adaptados a sus hospederos sin causar signos de enfermedad (Murphy y Webster 1990, Webster *et al.* 1992).

Los cambios son más prominentes en las glicoproteínas de superficie de los virus, pero también ocurren en cada uno de los ocho segmentos genéticos de los géneros A y B. Los resultados variables de la acumulación de cambios moleculares en los ocho segmentos del RNA, pueden ocurrir por diferentes mecanismos incluyendo: (i) mutaciones de punto (viraje antigénico), (ii) reordenamiento genético (viraje genético), (iii) partículas defectivas de interferencia y (iiii) reasociación del RNA. Cada uno de estos mecanismos puede contribuir a la evolución de los virus de influenza (Murphy y Webster 1990).

Las mutaciones, incluyendo sustituciones, deleciones e inserciones, son las más importantes para producir variación entre los virus de influenza. La falta de un mecanismo de lectura segura de las RNA polimerasas contribuye a la replicación errónea, en contraste con la mayor fidelidad de replicación dada por las DNA polimerasas. Cada ronda de replicación del virus da como resultado una población mixta con muchas variantes, muchas de ellas letales, pero con algunas se tienen mutaciones potencialmente ventajosas que pueden llegar a dominar bajo condiciones correctas de selección (Webster *et al.* 1992). Lo sorprendente de los recientes estudios del virus de influenza no es la extensión de la variación genética, sino la aparente estabilidad genética de los reservorios del virus de influenza en las aves acuáticas. Dado que los virus de influenza tienen genomas segmentados, la reasociación de estos segmentos es importante para producir diversidad rápidamente (Kingsbury 1990). La evidencia de que todos los virus actuales de influenza en mamíferos son probablemente derivados de aves acuáticas, indican que una extensa mezcla genética del virus existe, para dar lugar a futuros virus que puedan afectar a mamíferos en la naturaleza (Easterday y Hinshaw, 1991).

Los virus de influenza A son de particular interés para los médicos veterinarios, debido a que infectan diferentes especies de mamíferos y aves. En mamíferos, las manifestaciones clínicas son el resultado de infecciones localizadas en el epitelio del tracto respiratorio. En contraste con cuadros asintomáticos observados en aves infectadas con virus de BP, que replican en forma localizada en las mucosas, o bien infecciones sistémicas fatales causadas por variantes de AP del virus (Rott 1992). La enfermedad se detecta cuando hay un incremento significativo en la mortalidad, asociada a un cuadro sistémico y en las aves de postura además una disminución marcada en la producción de huevo (García *et al.* 1995a, Hernández *et al.* 1995a). Los signos clínicos de la IA son extremadamente variables y dependen de la especie afectada, edad, sexo, infecciones asociadas y factores ambientales. Algunos signos asociados incluyen: postración, disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, signos respiratorios de leves a severos, lagrimeo excesivo, edema de la cabeza y cara; cianosis de cresta, barbillas y metatarsos; desórdenes nerviosos y diarrea (Casaubon *et al.* 1996, Easterday y Hinshaw 1991, Harley *et al.* 1990, Hernández *et al.* 1995a, Monroy *et al.* 1995). En algunos casos la enfermedad es sobreaguda y las aves son encontradas muertas sin signos previos, ya que los periodos de incubación para las diferentes manifestaciones clínicas causadas por este virus, son extremadamente variables, pudiendo ir de pocas horas a 2 ó 3 días (Easterday y Hinshaw 1991).

La notificación oficial de la presencia de la IA en México por parte de la Dirección General de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, fue el 23 de mayo de 1994, con el aislamiento de tres cepas de virus de IA procedentes de granjas avícolas de los estados de Querétaro,

Hidalgo y México, que fueron identificadas posteriormente como H5N2 de BP. La IA hasta ese momento era considerada como un enfermedad exótica en el país (García *et al.* 1995c, Campos *et al.* 1996).

Vera (1995) describe el aislamiento y caracterización de un virus de la familia *Orthomyxoviridae* en coinfección con el virus de la bronquitis infecciosa en una granja de 3,000 aves de engorda de edades múltiples, ubicada en el municipio de Valle de Bravo, México. Posteriormente comprobó que se trataba de un virus de influenza A, por medio de pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales sobre células infectadas y demostrando que se comportaba como una cepa de BP, mediante el desafío intravenoso en aves susceptibles.

Como consecuencia de la presencia de la IA en México, se inició un programa de muestreo serológico y virológico para identificar las zonas avícolas del país afectadas. En ese momento el virus no representaba un riesgo directo, pero por antecedentes se sabía que este tipo de virus podría mutar de baja a alta patogenicidad (Campos *et al.* 1996).

Durante los meses de junio a diciembre de 1994, se desarrollaron acciones de: verificación de parvadas y granjas libres, aprobación de laboratorios de diagnóstico y médicos veterinarios, vigilancia serológica y virológica, aumento de la bioseguridad en granjas, la publicación quincenal del boletín informativo sobre influenza aviar de BP y la Norma Oficial Mexicana para la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar (Campos *et al.* 1996).

El 13 de enero de 1995, fue confirmado por el Laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales, el diagnóstico de un virus H5N2 de AP en tres granjas de postura comercial del estado de Puebla y posteriormente durante el mismo mes en el estado de Querétaro, afectando a 500,000 reproductoras pesadas. El 23 de enero del mismo año, en el Diario Oficial de la Federación aparecieron los lineamientos para la activación del Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA).

En el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-Microbiología, INIFAP), se iniciaron los trabajos de investigación encaminados a la evaluación de vacunas para prevenir los efectos devastadores de la enfermedad en las aves domésticas. Con base en los resultados obtenidos por Hernández *et al.* (1995a) respecto a que una dosis de vacuna inactivada, emulsionada, pudo proteger a las aves contra una exposición del virus de AP, se autorizó la vacunación, con lo cual México fue el primer país

en el mundo en recurrir al empleo de una vacuna contra el subtipo H5N2 del virus de IA, como medida de control.

La vacuna no previno la infección ni la eliminación viral que pudo ser detectada hasta 21 días post-desafío (PD) y en cantidad suficiente para causar la muerte de aves susceptibles puestas en contacto (Hernández *et al.* 1995b). Posteriormente se realizaron una serie de trabajos en los que se corroboró que las vacunas de IA producidas en México e inactivadas con  $\beta$ -propiolactona, inducen protección del 100% a una dosis de desafío de  $1 \times 10^{6.6}$  DLP<sub>50</sub>, a los 14 días post-vacunación (PV); mientras que las vacunas inactivadas con formalina confieren una protección del 100% a partir de los 21 días PV y que las vacunas combinadas IA-Enfermedad de Newcastle brindan una adecuada protección a los 21 días PV. Se apreció además, que los títulos de anticuerpos PV, en el suero de las aves, parece no ser indicativo de protección, ya que aves vacunadas, sin anticuerpos detectables por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, fueron protegidas al desafío con cepas de AP (García *et al.* 1995a b c d, Palacios *et al.* 1996 ).

Al evaluar la eficacia de la aplicación de la vacuna de IA en pollos de engorda con y sin anticuerpos maternos, se encontró una protección adecuada 21 días PV al desafío en aves sin anticuerpos maternos vacunadas al día de edad. En aves vacunadas al octavo día de edad la protección fue adecuada a los 14 días PV (Rodríguez *et al.* 1995, Rodríguez *et al.* 1996a b). Hernández *et al.* (1996a b), evaluaron la protección conferida por cuatro vacunas de IA en codornices, ya que previamente se aisló una cepa del virus de IA de esta especie que causó alta mortalidad y signos nerviosos en una granja de 5,000 animales. Este grupo de investigadores, lograron determinar que la cepa aislada de codornices no produce mortalidad ni signos clínicos por sí misma en pollos y codornices.

Mediante estudios realizados con anticuerpos monoclonales, la H5 muestra 5 epitopos definidos. La inmunización en pollos contra IA ha demostrado la inducción de anticuerpos hacia tres epitopos altamente inmunogénicos, los cuales son importantes para la protección al desafío con cepas de AP. Los anticuerpos producidos contra los otros dos epitopos parecen ser de baja avidéz y reducida afinidad (García *et al.* 1995a).

Los aislamientos realizados en los dos brotes de AP en México identificados como A/Chicken/Puebla/14585-622/94 (H5N2) y A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2), fueron estudiados por Cerón *et al.* (1996), demostrando que la secuencia de aminoácidos en el sitio de rompimiento de la HA, en ambas demostró el motivo (P-G-R-K-R-K-T-R ↓ G), en donde cada R y K representan aminoácidos básicos, compatible con virus de alta patogenicidad. Al compararse con otras cepas internacionales, los virus

aislados en México mostraron la misma secuencia que la cepa A/Turkey/England/92-60/91 (H5N1). Mediante la prueba tradicional de patogenicidad en pollos, se comprobó que ambas cepas causaron la muerte del 100% de las aves inoculadas por vía endovenosa e intramuscular independientemente de la dosis administrada. El patrón de reacción mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación con anticuerpos monoclonales, mostró algunas diferencias entre estas cepas.

Con base en estos resultados, Monroy *et al.* (1995) realizaron un estudio para diferenciar los signos clínicos y lesiones producidas por estas dos cepas de AP en pollos Leghor, Indian River y Rhode Island; encontrando en el examen histopatológico gliosis difusa, satelitosis, neuronofagia e infiltrado perivascular linfoide en encéfalo; en páncreas se encontraron extensas áreas de necrosis licuefactiva con focos linfoides; notable despoblación linfoide en bolsa de Fabricio, bazo y timo; dermatitis ulcerativa y necrótica con infiltrado difuso de heterófilos en cresta y barbillas; infiltrado intersticial multifocal de linfocitos en tejido renal e infiltrado linfoide difuso en la zona glandular del proventrículo.

Posteriormente, Casaubon *et al.* (1996) informan que pollos Leghorn e Indian River inoculados experimentalmente con la cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/1995 (H5N2), no presentaron cambios significativos en hígado, páncreas y riñon, salvo hiperemia leve a moderada con algunas hemorragias, en órganos linfoides predominó hiperemia, atrofia moderada de la bolsa de Fabricio y necrosis puntiforme en bazo, además de encontrar gran cantidad de pigmento de origen hemático disperso en capilares subepidérmicos. Al estudio ultraestructural observaron grandes acúmulos de virus en el interior de extensas cisternas localizadas en el citoplasma de heterófilos, leucocitos mononucleares, células endoteliales y pequeños grupos en el núcleo y membrana celular.

En un estudio anterior Hooper (1989) encontró, en pollos inoculados con la cepa A/Chicken/Victoria/A185/85 (H7N7), edema de barbillas y cresta, acompañado de infiltración heterofílica, despoblación linfoide en timo, necrosis de linfocitos peri-epiteliales en pulmones y tonsilas cecales, focos de necrosis en cerebro con reacción de la gliosis y picnosis; pérdida de linfocitos en bolsa de Fabricio y focos de necrosis coagulativa en páncreas. Lalithankunjamma *et al.* (1991) estudiaron los efectos del virus de IA en los embriones de pollo, los cuales presentaron cambios degenerativos a nivel vascular y celular, con congestión y migración de heterófilos.

Swayne y Slemons (1992) emplearon la técnica inmunohistoquímica con avidina-biotina-inmunoperoxidasa en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, localizando la nucleoproteína viral en el núcleo y citoplasma de las células de los túbulos renales. En 1994, Swayne *et al.*, informan que la

mortalidad en pollos inoculados endovenosamente con la cepa A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8), se asoció con falla y daño renal severo. La infección con este virus resultó en 44% de mortalidad, reducción de ganancia de peso y necrosis de los túbulos renales proximales y/o nefritis túbulo intersticial. En pollos de cinco semanas se presentó uremia, hipercalcemia e hiperfosfatemia, comprobando que se trata de una cepa nefropatogénica que causó lesiones más severas en aves Leghorn que en pollos de engorda.

Kodihalli *et al.* (1994) realizaron un estudio para evaluar el efecto de la infección del virus A/Turkey/Minnesota/534/78 (H6N1) sobre la función fagocítica de los macrófagos sistémicos y los macrófagos pulmonares de pavos, encontrando que la capacidad funcional de los macrófagos pulmonares está comprometida, predisponiendo a los pavos a infecciones bacterianas secundarias; los cambios histopatológicos en la tráquea fueron más pronunciados a los 6 días PI y no detectaron cambios significativos en el parénquima pulmonar.

Van Campen *et al.* (1989 ) informan que pollos inoculados con la cepa altamente patógena A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9), mostraron linfopenia severa, altos títulos virales en órganos linfoides, acompañado de daño severo en las poblaciones de linfocitos y pusieron de manifiesto, mediante la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa, la nucleoproteína viral en los linfocitos afectados en estados tempranos de la infección.

En 1989, se observó que la cepa A/Chicken/Pennsylvania/1370/1983 (H5N2) replica en células del parénquima de varios órganos del ave, especialmente en el epitelio respiratorio, cerebro, riñón, músculo y sistema linfoide; pero no se describió la localización en endotelios vasculares, para lo cual Brown *et al.* (1992) realizaron un estudio empleando la técnica de inmunohistoquímica, encontrando que esta cepa tiene afinidad por los endotelios de los capilares, corazón y encéfalo; la afinidad varió dependiendo de la edad y el tipo de aves.

Mo *et al.* (1997) empleando la técnica de inmunohistoquímica, comparan los cambios patológicos y la distribución del antígeno viral en pollos inoculados experimentalmente con cepas de BP y AP. Los pollos inoculados con cepas de AP (A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2), A/Chicken/Victoria/A185/85 (H7N7) y A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N2) ), tuvieron diferentes signos clínicos y la nucleoproteína viral se demostró en células del corazón, páncreas, riñon, cerebro, tráquea, pulmón y músculo esquelético; por el contrario, en los pollos inoculados con las cepas de BP (A/Chicken/Pennsilvanya/21525/83 (H5N2) y A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8) ), la replicación viral pudo ser demostrada unicamente en el tracto respiratorio y digestivo; en muchas aves no se produjeron lesiones pero existió evidencia serológica de

infección. De estos estudios es aparente que cada cepa de virus de IA tiene diferente afinidad por los tejidos y varía el tipo de lesiones.



## **1.2 Justificación**

Las bases moleculares de la virulencia de los virus de influenza A han sido extensamente estudiadas y se han realizado varios trabajos en donde se describen los cambios que causan los diferentes subtipos del virus en las etapas avanzadas de la enfermedad. Se ha demostrado también, que los virus altamente patógenos se replican y pueden ser recuperados de una gran variedad de órganos; pero aun no se conoce cuáles son los eventos que se suceden en los tractos respiratorio y digestivo durante las primeras horas post-exposición por vía respiratoria a una cepa de AP en pollos susceptibles o inmunizados contra el virus. Así mismo, no se sabe si las aves inmunizadas desarrollan viremia, ya que se ha demostrado previamente que aves vacunadas y desafiadas eliminan virus hasta 21 días post-desafío en secreciones respiratorias y excretas.

## **1.3 Hipótesis**

En aves susceptibles a influenza aviar, las cepas altamente patógenas del virus llevan a cabo una primera fase de replicación en las células epiteliales del tracto respiratorio superior e intestino delgado, posteriormente se produce una fase de viremia y así el virus es diseminado a todas las células del organismo, causando la muerte del animal. Por el contrario, en aves con anticuerpos inducidos por vacunación, el virus se replica únicamente en células epiteliales de los tractos respiratorio y digestivo, sin producirse viremia con lo cual se previene la mortalidad.

## **1.4 Objetivo**

Contribuir al conocimiento de la patogenia del virus de influenza aviar (H5N2) altamente patógeno en pollos susceptibles y pollos inmunizados contra el virus.

### **1.4.1 Objetivos específicos**

1.- Describir la patogenia de la influenza aviar altamente patógena durante las primeras 72 horas post-exposición al virus en aves libres de patógenos específicos, a partir de la descripción de los cambios morfológicos y la determinación de los sitios primarios de replicación viral empleando la técnica de inmunohistoquímica.

2.- Determinar si los cambios que se suceden en los tractos respiratorio y digestivo durante las primeras etapas de la infección con el virus de influenza aviar altamente patógeno tienen el mismo patrón en aves susceptibles y en aves con anticuerpos inducidos por vacunación.

3.- Determinar el momento en que se sucede la primera viremia en aves susceptibles y conocer los títulos virales circulantes.

4.- Conocer si las aves con anticuerpos contra influenza aviar, inducidos por vacunación desarrollan viremia después de la exposición por vía respiratoria a una cepa altamente patógena del virus, mediante la demostración y titulación del virus circulante en sangre.

## **2.-MATERIAL Y METODOS**

### **2.1 Lugar**

El trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio y de las unidades de aislamiento de alta seguridad del Proyecto Estrategias para el Control y Erradicación de la influenza aviar en México, CENID-Microbiología, INIFAP, ubicadas en el Km 15.5 de la Carretera Federal México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México, D.F.

### **2.2 Animales de experimentación y alojamiento**

Aves Leghorn, machos y hembras, libres de patógenos específicos (Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A., Tehuacán, Puebla) de un día de edad. Las aves se mantuvieron en baterías convencionales con calefacción local proporcionada por focos infrarrojos, recibieron alimento comercial no medicado, agua *ad libitum* y se identificaron individualmente con una grapa en el ala. Las aves se alojaron en unidades de aislamiento con sistema de filtración a presión negativa, filtros absolutos y una cortina de luz ultravioleta a la salida del aire para evitar escape de virus. Los grupos de aves fueron manejados de manera independiente y apegándose a estrictas normas de bioseguridad.

### **2.3 Diseño experimental**

Se formaron dos grupos de 100 aves cada uno. Los grupos se mantuvieron en unidades de aislamiento independientes. Uno de los grupos fue inmunizado contra IA y el otro permaneció sin inmunizar.

### **2.4 Vacunación**

A los 8 días de edad las aves de uno de los grupos (aves inmunizadas, Av-Inm) se inmunizaron por vía subcutánea en el tercio medio posterior del cuello con 0.5 ml de una vacuna comercial preparada con la cepa A/Chicken/CPA-238/94 (H5N2), apatógena, inactivada y emulsionada en aceite mineral. Las aves del otro grupo permanecieron sin inmunizar (Aves susceptibles, Av-Susc).

## 2.5 Serología

A los 0, 7, 14 y 21 días PV, se seleccionaron aleatoriamente 50% de las aves de cada grupo, de las cuales se tomó una muestra de sangre de la vena braquial, para la obtención de suero. Este se separó por los métodos convencionales y fue almacenado a  $-20^{\circ}$  C. La titulación de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación específicos contra IA, se realizó mediante la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH) según lo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Influenza Aviar, utilizando como antígeno a la cepa A/Chicken/CPA-238/94 (H5N2) inactivada con  $\beta$ -propiolactona. Se utilizó un suero testigo negativo y uno positivo de referencia al momento de realizar la prueba.

## 2.6 Inoculación con una cepa altamente patógena de Influenza Aviar

A las cuatro semanas de edad, ambos grupos de aves fueron inoculados con 0.2 ml/ave de líquido alantoideo infectado con la cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógena con un título viral de  $1 \times 10^3$  DLEP<sub>50</sub>/0.2 ml. El desafío se realizó, instilando el líquido alantoideo directamente dentro de las fosas nasales, con un catéter de teflón adaptado a una jeringa; el tiempo transcurrido de la inoculación de la primera ave con respecto a la última no excedió de 10 minutos.

La cepa A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) fue aislada en enero de 1995 de una parvada de reproductoras pesadas, que presentaron cese total de la producción de huevo y lesiones compatibles con IA AP. Es una cepa altamente patógena, con alta eficiencia para producir placas en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo, altamente letal en pruebas de patotificación en pollos y con una secuencia de aminoácidos en el sitio de rompimiento de la hemoaglutinina compatible con los virus de AP (P-G-R-K-R-K-T-R ↓ G), correspondiente a (...Pro-Gli-Arg-Lis-Arg-Lis-Tre-Arg ↓ Gli...).

## 2.7 Colección de sangre para aislamiento viral y muestras de tejidos para histopatología e inmunohistoquímica

Considerando el momento de la inoculación como la hora cero, se tomaron aleatoriamente 3 aves de cada grupo a las 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 horas post-inoculación (hpi). De cada ave se tomó una muestra de sangre directamente del corazón en una relación 1:1 (v/v) en anticoagulante de Alseaver estéril. Las aves fueron sacrificadas, se realizó la necropsia y se tomaron muestras en formalina amortiguada al 10% (pH 7.0) de: cresta, timo, cornetes nasales, laringe,

tráquea, pulmón, proventrículo, porción media de duodeno y páncreas, tonsilas cecales e íleon y bolsa de Fabricio. Antes a esto, a los 20, 40, 60 y 80 minutos post inoculación, se tomaron 3 aves de cada grupo, de las cuales únicamente se tomó la muestra de sangre.

Las muestras de órganos tuvieron una fijación en formalina de 24 a 48 horas, posteriormente fueron deshidratadas con alcoholes e incluidas en parafina a 56° C (Paraplast X-TRA Tissue embedding medium, Oxford, St. Louis, Mo.). Se realizaron cortes de 5 µm de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y cortes sin tefir se emplearon para la técnica de inmunohistoquímica.

## **2.8 Técnica de inmunohistoquímica para localización de nucleoproteína viral:**

### **2.8.1 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos monoclonales**

Se utilizó un kit comercial (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA.), siguiendo los procedimientos indicados por el fabricante con ciertas modificaciones: 1) la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución al 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente, 2) los cortes fueron bloqueados con suero normal de caballo al 10% por 10 minutos, 3) el anticuerpo primario fue un monoclonal contra nucleoproteína viral (proporcionado gentilmente por la Doctora Virginia S. Hinshaw, College of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisc.) a una dilución de 1:800 por 40 minutos a temperatura ambiente 4) el anticuerpo secundario fue un anti-ratón biotinilado (Anti-Mouse IgG, preparado en caballo, Vector Laboratories), 5) el cromógeno empleado fue 3,3' diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Vector). Los tiempos de incubación fueron a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Todos los lavados se realizaron con solución salina fosfatada pH 7.2.

### **2.8.2 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos policlonales producidos en cabra**

Se realizó el procedimiento descrito anteriormente, pero con modificaciones: 1) la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución al 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 5 minutos, 2) los cortes fueron bloqueados con suero normal de caballo al 20% por 10 minutos, 3) como anticuerpo primario se empleó un suero policlonal contra la nucleoproteína viral producido en cabra (proporcionado gentilmente por el Doctor Robert G. Webster, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee) a una dilución de 1:100 por 40 minutos a temperatura ambiente, 4) el anticuerpo secundario fue un anti-cabra biotinilado (Anti-goat IgG, preparado en caballo, Vector Laboratories), 5) el cromógeno empleado fue 3,3' diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Vector).

### **2.8.3 Complejo avidina-biotina-peroxidasa con anticuerpos policlonales producidos en pollo**

En este caso, el procedimiento tuvo las siguientes modificaciones: 1) la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución al 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 10 minutos, 2) los cortes fueron bloqueados con suero normal de cabra al 20% por 10 minutos, 3) como anticuerpo primario se empleó un suero policlonal contra el virus de influenza aviar producido en pollos libres de patógenos específicos (CENID-Microbiología, INIFAP) a diluciones de 1:10 a 1:200, 4) el anticuerpo secundario fue un anti-pollo biotinilado (Anti-chicken IgG, elaborado en cabra, Vector Laboratories), 5) el cromógeno empleado fue 3,3' diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Vector). Los cortes con el anticuerpo primario se incubaron a 4<sup>o</sup>C por 24 horas.

### **2.8.4 Sistema de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina**

El montaje y realización de la técnica se efectuó en el United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southeast Poultry Research Laboratory, Athens, Georgia.

Se montó la técnica descrita por Slemons (1990) con modificaciones de Swayne (1995): 1) se efectuó la recuperación del antígeno viral, mediante el calentamiento de los cortes en horno de microondas en una solución de citratos pH neutro (Antigen Retrieval Citra Solution, BioGenex, San Ramon, CA.), 2) el anticuerpo primario fue un monoclonal contra nucleoproteína viral (proporcionado gentilmente por la Doctora Virginia S. Hinshaw, College of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisc.) a una dilución de 1:2000 por 24 horas a 4<sup>o</sup> C, 3) se empleó un sistema comercial de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina (Super Sensitive Immunodetection System, inmunoglobulinas biotiniladas contra anticuerpos de ratón, conejo, cuye y rata, Biogenex, San Ramon, CA), 4) el cromógeno empleado fue nueva fushina (New Fuchsin Substrate Pack, BioGenex).

### **2.8.5 Sistema de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina con anticuerpos policlonales producidos en conejo**

Se realizó la técnica descrita en el parrafo anterior, pero empleando un suero policlonal contra el virus de influenza tipo A, hecho en conejo a una dilución de 1:100 (CENID-Microbiología, INIFAP). Para la preparación de los anticuerpos policlonales se empleó como antígeno al virus de IA A/Chicken/México/CPA-

238/94 (H5N2) de baja patogenicidad. El virus se purificó por ultracentrifugación en un gradiente continuo de sacarosa. Se inocularon tres conejos Nueva Zelanda machos, con 10,000 unidades hemoaglutinantes (UH) de virus purificado en adyuvante completo de Freund (Sigma) vía subcutánea; posteriormente, los animales fueron inoculados en dos ocasiones más con 10,000 UH de virus por vía subcutánea, con un intervalo de dos semanas entre cada inoculación. Siete días después de la última inoculación, los conejos fueron sangrados y se realizó una mezcla de los sueros. El suero policlonal tuvo reacción contra la nucleoproteína viral en las pruebas de inmunodifusión en gel y contra la hemoaglutinina viral en las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación.

#### **2.8.6 Sistema de detección de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina con anticuerpos monoclonales y policlonales producidos en conejo**

Se modificó la técnica descrita por Slemons (1990) y Swayne (1995): 1) se efectuó la recuperación del antígeno viral, mediante la digestión de los tejidos con proteinasa K (Dako Corporation, Carpinteria, CA) y el calentamiento de los cortes en baño María a 90°C por 20 minutos en una solución de citratos pH neutro (Antigen Retrieval Citra Solution, BioGenex, San Ramon, CA.), 2) el anticuerpo primario fue el monoclonal contra nucleoproteína viral (proporcionado gentilmente por la Doctora Virginia S. Hinshaw, College of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, Wisc.) a una dilución de 1:2000 y el suero policlonal de conejo a una dilución de 1:100 (cada anticuerpo se utilizó de forma independiente), los cortes se incubaron 24 horas a 4°C, 3) se empleó un sistema comercial de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina (DAKO LSAB 2 Kit, Alkaline phosphatase, inmunoglobulinas biotiniladas contra anticuerpos de ratón y conejo, Dako), 4) el cromógeno empleado fue nueva fushina (Dako).

En todas las técnicas anteriores se utilizaron como controles positivos y negativos órganos incluidos en parafina y laminillas donadas por el Doctor David E. Swayne (Southeast Poultry Research Laboratory, Athens, Georgia).

#### **2.9 Calificación de lesiones**

Al efectuarse el estudio microscópico de las muestras de órganos, las lesiones fueron calificadas con un método numérico de acuerdo a su severidad (1=leve, 2=moderada, 3=severa), extensión (1=pequeña, 2=moderada, 3=amplia) y cantidad (1=escasa, 2=moderada, 3=abundante). La media histológica de lesiones (MHL) por órgano y grupo, se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones observadas en cada órgano y dividirlo entre el número de pollos muestreados por grupo y por

tiempo.

## **2.10 Aislamiento e identificación viral**

Las muestras de sangre se dividieron en dos partes; una de las partes sirvió para realizar el aislamiento viral y la otra, se conservó a  $-70^{\circ}$  C para la titulación viral. Para aislar el virus, se inocularon embriones libres de patógenos específicos de 9 a 11 días, vía cavidad alantoidea con 0.2 ml de cada muestra. Los embriones fueron incubados a  $35^{\circ}$  C por 48 a 72 horas. Los embriones que no murieron durante las 72 horas, fueron sacrificados a  $4^{\circ}$  C durante 12 horas. La identificación viral se realizó mediante las pruebas de hemoaglutinación rápida en placa y la de inhibición de la hemoaglutinación con antisuero específico. La mortalidad embrionaria de las primeras 24 horas fue descartada.

## **2.11 Titulación viral**

Se realizó una mezcla en partes iguales de las muestras de sangre positivas al aislamiento viral de aves del mismo grupo y hora de muestreo. Se empleó la mitad correspondiente de la muestra que había permanecido congelada a  $-70^{\circ}$  C. Se realizaron diluciones décuples seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  de la sangre en solución salina fosfatada pH 7.2 (considerando que la muestra se encontraba en una dilución de 1:2 en el anticuagulante de Alseiver) y con las cuales, se inocularon grupos de 5 embriones libres de patógenos específicos de 11 días. Los embriones se inocularon con 0.2 ml de cada dilución por vía cavidad alantoidea y se incubaron a  $35^{\circ}$  C hasta el momento de su muerte (48 a 72 horas); para comprobar que la mortalidad embrionaria fue producida por el virus, se realizaron las pruebas de hemoaglutinación rápida en placa y de inhibición de la hemoaglutinación con antisuero específico para IA de cada líquido alantoideo. La titulación viral se realizó con base a dosis letales para embrión de pollo al 50% (DLEP<sub>50</sub>) por el método de Reed y Muench (1938).



### **3.- RESULTADOS**

#### **3.1 Respuesta a la vacunación**

La respuesta serológica de las Av-Inm, después de la vacunación, se presentan en el Cuadro 1. Los resultados representan la media geométrica de los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, específicos para IA y el porcentaje de seroconversión en las aves. Los anticuerpos se detectaron a los 7 días PV en el 33% de las aves; mientras que a los 21 días PV, el porcentaje de seroconversión fue del 100%. Las Av-Susc permanecieron seronegativas a IA durante los 21 días.

#### **3.2 Signos clínicos post-inoculación**

La manifestación de signos clínicos en las Av-Susc, comenzó a partir de las 32 hpi. Los signos de la infección fueron variables y se hicieron más evidentes conforme pasó el tiempo. Las aves presentaron disminución en el consumo de alimento y agua, postración, plumas erizadas, apnea leve, lagrimeo, edema de la cabeza leve, cianosis de cresta, barbillas y metatarsos; uno de los signos más relevantes fue diarrea verdosa a partir de las 48 hpi.

Las Av-Inm, no mostraron signos clínicos de la enfermedad después del desafío.

#### **3.3 Mortalidad post-inoculación**

La mortalidad fue muy elevada en las Av-Susc en el curso de las 72 hpi; 4 aves murieron entre las 32-36 hpi, 10 aves entre las 52-56 hpi, 9 aves a las 60 hpi y 10 aves a las 64 hpi. Las aves que murieron de forma natural, no fueron consideradas para la toma de muestras y las aves que lograron sobrevivir después de las 72 hpi, fueron sacrificadas al terminar el muestreo.

En las Av-Inm, no hubo mortalidad después de la inoculación.

#### **3.4 Hallazgos a la necropsia**

Los cambios macroscópicos más importantes en las Av-Susc fueron: congestión en hígado, páncreas y riñón; en órganos linfoides, especialmente en el timo, congestión, presencia de petequias en moderada cantidad y atrofia de moderada a severa; en el tracto respiratorio, se observó congestión de

moderada a severa en cornetes nasales y laringitis catarral leve; las lesiones cutáneas de barbillas, metatarsos, dedos y cojinete plantar, fueron las más severas y consistieron en tumefacción del epitelio con acúmulos de exudado serohemorrágico subepitelial, con amplias áreas de necrosis y descamación.

Las Av-Inm, no presentaron cambios patológicos después de la inoculación.

### **3.5 Hallazgos histopatológicos**

#### **3.5.1 Cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales**

Las lesiones encontradas al examen histológico de las aves, fueron variadas y su severidad y distribución se incrementó conforme pasaron las hpi. En el Cuadro 2, se presentan los porcentajes de aves con lesiones en cada uno de los grupos; en el Cuadro, los porcentajes corresponden al conjunto de aves muestreadas en períodos de 22 a 24 hpi durante las 72 horas del muestreo.

En las Av-Susc, el 38% de las animales muestreados durante las primeras 24 hpi, presentaron rinitis no supurativa; mientras que entre las 28-48 hpi, la lesión se manifestó como rinitis hemorrágica no supurativa en el 50% de los animales y entre las 52-72 hpi, el 100% de las aves tuvo ésta lesión. En las Av-Inm, el 55% de los animales de las 52-72 hpi, presentaron rinitis no supurativa y sólo un 11% presentó rinitis hemorrágica no supurativa.

En los senos infraorbitarios, las lesiones en las Av-Susc, correspondieron a un proceso supurativo o hemorrágico (Cuadro 2), mientras que las Av-Inm, únicamente presentaron sinusitis no supurativa.

En el caso de las glándulas salivales palatinas, las Av-Susc, presentaron inflamación no supurativa y atrofia del epitelio glandular (Figuras 15 y 16); mientras que las Av-Inm, únicamente tuvieron un proceso inflamatorio no supurativo (Cuadro 2).

La figura 1 corresponde a la media histológica de lesiones (MHL) de los cornetes nasales, senos infraorbitarios y glándulas salivales; cada punto en la gráfica, representa la MHL de tres aves en cada uno de los grupos. Como se puede observar, existe diferencia numérica entre los dos grupos, ya que la MHL representa la severidad, extensión y cantidad de las lesiones.

### **3.5.2 Laringe**

El porcentaje de Av-Susc, que presentaron laringitis no supurativa fue del 71% entre las 2-24 hpi, 89% entre las 28-48 hpi y 61% entre las 52-72 hpi (Cuadro 3); en las Av-Inm, el porcentaje de aves con ésta lesión fue menor, encontrándose que hasta el 44% de las aves muestreadas entre las 52-72 hpi, no presentaron cambios patológicos significativos (Cuadro 3).

En las Av-Susc, la laringitis no supurativa se acompañó de necrosis unicelular dispersa o apoptosis en el epitelio; lesión que no se presentó en las Av-Inm.

La MHL correspondiente a la laringe se presenta en la figura 2; donde se puede observar que los valores mayores son para las Av-Susc, ya que la MHL fue de 5.0 a las 4 hpi y 44 hpi, mientras que en las Av-Inm, los valores de la MHL fueron de 2.0 y 0.33, respectivamente.

### **3.5.3 Tráquea**

En ambos grupos de aves, se presentó traqueitis no supurativa; siendo en las Av-Susc, donde hubo mayor porcentaje de animales con ésta lesión (Cuadro 4). El 78% de las Av-Inm, muestreadas entre las 52-72 hpi, no mostraron cambios patológicos significativos (Cuadro 4).

La figura 3, muestra la MHL correspondiente a la tráquea, donde las Av-Susc tienen valores que van de 0 a 2, llegando a ser de 2 a las 28 y 40 hpi; mientras que en las Av-Inm, el valor máximo es de 1 a las 4 y 60 hpi.

### **3.5.4 Pulmón**

El porcentaje de aves que no presentaron cambios patológicos significativos entre las 2-24 hpi, fue del 43% en las Av-Susc y del 33% en las Av-Inm (Cuadro 5); entre las 52-72 hpi, el 33% de las aves en cada uno de los grupos, no presentaron lesiones. El hallazgo que se encontró con mayor frecuencia en ambos grupos, fue hiperplasia linfoide bronquial; en las Av-Inm, el 72% de los animales entre las 28-48 hpi presentó ésta condición, mientras que en las Av-Susc, sólo el 28% de los animales la presentaron (Cuadro 5). En ambos grupos se observó bronquitis no supurativa; aunque en las Av-Inm, únicamente se encontró entre las 2-24 hpi. Las Av-Susc, presentaron neumonía intersticial no supurativa focal, que posteriormente se manifestó como neumonía difusa en el 39% de las aves entre las 52-72 hpi.

La MHL del pulmón se presenta en la figura 4, donde se puede observar que ambos grupos se sitúan en una misma línea, con valores de la MHL que van de 0 a 1.66, lo que indica que aunque hubo lesiones en pulmón, estas fueron leves.

### **3.5.5 Proventrículo**

Las lesiones encontradas en éste órgano, se localizaron en la mucosa y glándulas gástricas, sin verse afectada la capa muscular o la serosa del mismo. En ambos grupos de aves, las lesiones encontradas fueron: inflamación no supurativa de la mucosa, adenoproventriculitis no supurativa, metaplasia y descamación del epitelio glandular, dilatación glandular y atrofia del epitelio de la mucosa. El Cuadro 6, presenta los porcentajes de aves que presentaron las diferentes lesiones. Entre un 11 y 17% de las Av-Susc, tuvieron atrofia de las glándulas; lesión que no se observó en las Av-Inm. El porcentaje de Av-Susc, con atrofia de la mucosa fue del 11% entre las 28-48 hpi y del 28% entre las 52-72 hpi; mientras que en las Av-Inm, solamente el 11% de los animales muestreados entre las 52-72 hpi, tuvo atrofia de la mucosa.

La MHL en el proventrículo fue muy variada (Figura 5). En general, las Av-Susc tuvieron los valores más altos, presentándose un pico a las 12 hpi y otro a las 20 hpi, con valores de 9.66 y 9.0, respectivamente. En las Av-Inm, la MHL de las aves de las 2, 36, 60 y 64 hpi, fue mayor que en las Av-Susc, incluso el valor de las 60 hpi es dos veces mayor.

### **3.5.6 Duodeno**

En ambos grupos de aves se encontraron lesiones en duodeno, pero con diferencias en los porcentajes. En las Av-Susc, el porcentaje de animales con hemorragias, enteritis no supurativa y necrosis unicelular del epitelio, fue mayor que las Av-Inm (Cuadro 7); mientras que en las Av-Inm, se presentó un mayor porcentaje de aves con edema subepitelial y heterofilia. La necrosis unicelular dispersa del epitelio, se presentó en el 44% de las Av-Susc entre las 28-48 hpi y en el 78% entre las 52-72 hpi; contrastando con las Av-Inm, en donde solamente el 8% de los animales entre las 52-72 hpi, la presentaron (Cuadro 7).

En la figura 6, se puede observar que a partir de las 32 hpi la MHL de las Av-Susc es mayor a las Av-Inm, alcanzando un valor de 12.66 a las 56 hpi, para después descender a 8.16 a las 60 hpi y llegar a 7.0 a las 68 hpi. En las Av-Inm, la MHL se mantuvo en un rango que va de 3.16 a 6.0; mientras que en las Av-Susc, el rango fue de 1.50 hasta 12.66.

### **3.5.7 Páncreas**

El porcentaje de animales que no presentaron cambios patológicos significativos fue mayor en las Av-Inm, llegando hasta un 38% entre las 52-72 hpi, mientras que en las Av-Susc, sólo el 22% no tuvieron cambios en el mismo período (Cuadro 8). Los hallazgos encontrados en ambos grupos fueron: menor cantidad de gránulos de zimógeno, presencia de acúmulos linfoides y necrosis unicelular dispersa; siendo mayores los porcentajes en las Av-Susc. El 16% de las Av-Susc, entre las 52-72 hpi, presentaron degeneración vacuolar, lesión que no se manifestó en las Av-Inm.

La MHL del páncreas se presenta en la figura 7, donde se puede observar que ambos grupos se mantienen en un rango que va de 0.33 a 2.66, hasta las 56 hpi. Las Av-Susc, presentaron un pico de 6.66 a las 60 hpi, debido a que las tres aves presentaron menor cantidad de zimógeno y degeneración vacuolar severa.

### **3.5.8 Ileon**

Las lesiones encontradas en el órgano, se localizaron exclusivamente en la mucosa y consistieron en: hemorragias, enteritis no supurativa, heterofilia, necrosis unicelular dispersa del epitelio, edema en las puntas de las vellosidades, fusión de vellosidades y atrofia de la mucosa (Cuadro 9). Una de las lesiones más severa y frecuente fue la necrosis unicelular dispersa del epitelio, que se presentó en el 11% de las Av-Susc entre las 28-48 hpi, para aumentar al 78 % entre las 52-72 hpi; mientras que en las Av-Inm, sólo un 22% de los animales entre las 52-72 hpi la presentaron.

La figura 8, muestra la MHL del ileon de ambos grupos de aves. Las Av-Inm, tuvieron una MHL de 7.33 a las 2 hpi, mientras que en las Av-Susc el valor fue de 4.0; posteriormente, las Av-Susc presentaron los valores máximos entre las 52 y 60 hpi.

### **3.5.9 Timo**

A partir de las 2 hpi, en ambos grupos, se presentaron hemorragias, heterofilia, apoptosis y atrofia en la zona cortical. En las Av-Susc, el 100% de los animales después de las 28 hpi, presentaron apoptosis en la zona cortical y despoblación linfóide en la zona medular; en contraste con las Av-Inm, donde únicamente se presentó apoptosis cortical, sin verse afectada la zona medular (Cuadro 10).

La MHL del timo, se muestra en la figura 9, donde se puede observar que a partir de las 48 hpi hay un incremento en los valores de la MHL de las Av-Susc y ésto debido a que a partir de ese momento la apoptosis cortical, la despoblación linfoide y la atrofia, fueron severas (Figuras 17 y 18).

#### **3.5.10 Tonsilas cecales**

En ambos grupos de aves se presentaron hemorragias, hiperplasia linfoide, apoptosis, necrosis unicelular dispersa y heterofilia. La apoptosis y la necrosis unicelular dispersa, se presentaron en un mayor porcentaje de las Av-Susc, llegando al 41% de aves con apoptosis y un 80% con necrosis unicelular dispersa, entre las 52-72 hpi; mientras que en las Av-Inm, el 59% de los animales entre las 52-72 hpi presentaron hiperplasia linfoide (Cuadro 11).

La MHL de las tonsilas cecales, se presenta en la figura 10. El comportamiento de la MHL en ambos grupos es muy similar hasta las 44 hpi, momento en el que la MHL de las Av-Susc, comienza a aumentar para llegar a un valor máximo de 10.33 a las 60 hpi, para posteriormente descender a las 68 hpi.

#### **3.5.11 Bolsa de Fabricio**

El 100% de las aves de ambos grupos presentaron hiperplasia epitelial, despoblación linfoide y fibrosis (Cuadro 12). La única variación fue el porcentaje de aves que presentaron exudado leucocitario.

La figura 11 muestra la MHL de la bolsa, donde se puede observar que durante todas las 72 hpi, ambos grupos se sitúan prácticamente en una misma línea, con valores de 8 a 9.

#### **3.5.12 Cresta**

Las lesiones más aparentes producidas por el virus, se localizaron en éste órgano. El 43% de las Av-Susc, permanecieron sin cambios patológicos significativos antes de las 24 hpi; a partir de las 28 hpi, presentaron infiltrado linfocitario, hiperemia subepitelial, edema subepitelial, hemorragias subepiteliales, heterofilia, vacuolización del epitelio y estasis sanguínea con presencia de glóbulos rojos desnudos (Cuadro 13). Después de las 52 hpi, el 100% de las Av-Susc, mostraron las lesiones antes mencionadas (Figuras 19 y 20). Las Av-Inm, no presentaron cambios patológicos en la cresta (Cuadro 13).

El comportamiento de la MHL de la cresta, se presenta en la figura 12. En las Av-Susc, el valor de

la MHL comenzó a incrementarse de manera significativa a partir de las 28 hpi. El valor de las MHL a las 28 hpi fue de 1.0, mientras que la MHL a las 40 hpi fue de 7.0, lo que representa un aumento de 6.0, en un período de 12 horas. Entre las 40 y 48 hpi, la MHL se incrementó solamente de 7.0 a 8.0, momento a partir del cual la severidad, extensión y cantidad de las lesiones, provocó un incremento de 10.0 en el valor de la MHL, para alcanzar el valor de 18.0 a partir de las 52 hpi y mantenerse en éste hasta las 72 hpi.

### **3.6 Inmunohistoquímica**

No se demostró la presencia del virus en los órganos. En los controles positivos el antígeno viral se presentó como puntos de color rojo en el citoplasma de diferentes células.

### **3.7 Aislamiento e identificación viral**

A partir de las muestras de sangre se pudo identificar y cuantificar el virus de influenza aviar de alta patogenicidad en las Av-Susc. El aislamiento e identificación del virus se realizó a partir de las 28 hpi en el 100% de las aves. La figura 13, muestra el comportamiento de los títulos virales circulantes en la sangre de las aves después de la infección. El título del virus circulante de las aves a las 28 hpi fue de  $10^{6.12}$  DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre; posteriormente el título de virus circulante se mantuvo en un rango de  $10^{5.69}$  a  $10^{8.06}$  DLEP<sub>50</sub>/ml, entre las 32 y 68 hpi. La mayor cantidad de virus circulante, lo tuvieron las aves a las 72 hpi, con un título de  $10^{9.04}$  DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre.

La figura 14, muestra la cantidad de DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre del virus de IA AP circulante en la sangre de las aves. La conversión del título viral a números naturales, indica que entre las 28 y 68 hpi, las aves tuvieron menos de 200,000,000 DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre; a las 72 hpi, el título de virus circulante fue de  $10^{9.04}$  DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre, lo que al convertirse a números naturales equivale a 1,096,478,196 DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre, siendo éste el valor máximo que se identificó.

Las Av-Inm no presentaron viremia.

#### 4.- DISCUSION

La inoculación de Av-Susc y de Av-Inm, con un virus de IA de alta patogenicidad aislado en México, por vía intranasal, simulando una ruta natural de exposición, resultó en la presentación de dos formas de la enfermedad. En las Av-Susc, posterior a la inoculación del virus, hubo signos clínicos, mortalidad y presencia de virus circulante en la sangre; mientras que en las Av-Inm, a pesar de que hubo lesiones a nivel microscópico, estas fueron generalmente menos severas que las que presentaron las Av-Susc, incluso en la cresta no se observaron lesiones, a diferencia de las Av-Susc, donde fue el tejido más afectado, tal como se reflejó en la MHL. Las diferencias entre ambos grupos de aves fueron marcadas, y a pesar de que no se pudo demostrar mediante la técnica de inmunohistoquímica la presencia del virus en los tejidos, en las Av-Susc se presentó viremia con altos títulos virales circulantes después de las 28 hpi, situación que no sucedió en el grupo de Av-Inm.

La evaluación de la respuesta serológica de las Av-Inm, a través de la cuantificación de los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación específicos para IA, correspondió a lo observado por otros investigadores mexicanos (Hernández *et al.* 1995a b, García *et al.* 1995 a b c, Palacios *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 1995, Rodríguez *et al.* 1996a b). Sólo fue hasta el día 21 PV, cuando el 100% de las aves de éste grupo seroconvirtieron. La vacunación de las aves evitó la viremia, la presentación de signos clínicos y mortalidad.

Webster *et al.* (1991), señalan que no solamente la inmunidad humoral juega un papel importante en la protección de las aves contra el subtipo H5N2 del virus de IA. Este autor considera que la inmunidad celular mediada por linfocitos T, puede bloquear que el virus afecte sitios vitales, con lo que se evita la mortalidad pero no la infección. Así mismo, mencionan que aunque las aves desarrollen niveles bajos de anticuerpos, estos podrían participar para desencadenar una respuesta anamnésica a la infección viral.

La presencia de una viremia constante después de las 28 hpi en las Av-Susc, fue uno de los hallazgos más importantes, no hay estudios previos donde haya sido evaluado ésta condición. La viremia fue el factor que más influyó en la presentación de la enfermedad y el desarrollo de lesiones, ya que mediante ésta condición, el virus pudo llegar a todas las células del organismo de las aves. La titulación del virus circulante en sangre (Figura 13), sugiere que hubo varios ciclos de replicación, antes de diseminarse. La dosis de inoculación fue de  $10^3$  DLEP<sub>50</sub>/0.2 ml de líquido alantoideo, mientras que el título promedio de virus circulante a las 28 hpi fue de  $10^{6.2}$  DLEP<sub>50</sub>/ml. La replicación viral fue muy eficiente, si se toma en cuenta que la dosis inoculada contenía 1,000 DLEP<sub>50</sub> de virus y a las 72 hpi, la cantidad de virus circulante



fue de 1,096,478,196 DLEP<sub>50</sub>/ml de sangre (Figura 14).

Varios autores han empleado la vía de inoculación endovenosa, que simula un estado de viremia en las aves; ésta forma de inoculación constituye la base de la prueba de patogenicidad de los virus de influenza. Esta vía de inoculación fue utilizada en forma empírica para determinar no sólo la patogenicidad de las cepas virales, sino las lesiones en los órganos del animal (Slemons and Swayne, 1990; Slemons *et al.* 1990; Swayne and Slemons, 1992; Swayne *et al.* 1994; Swayne and Slemons, 1994; Shalaby *et al.* 1994; Hooper *et al.* 1995; Slemons and Swayne, 1995).

La virulencia de los virus está determinada por varios factores. Las bases moleculares establecen que el producto del gen de la hemoaglutinina es el principal determinante. Las moléculas de hemoaglutinina tienen que ser divididas en dos subunidades (HA1 y HA2) para producir una partícula viral infecciosa madura. El rompimiento ocurre como resultado de la acción de enzimas proteolíticas al reconocer un sitio específico de rompimiento. El rompimiento está determinado por la cantidad de aminoácidos básicos presentes en esa región y la disponibilidad física para las proteasas intracelulares. Un incremento en la virulencia, se debe al aumento en el número de aminoácidos básicos que proveen el reconocimiento de proteasas intracelulares en muchos órganos. También, la ausencia del sitio de glicosilación facilita la acción de estas enzimas, lo que permite la replicación del virus en una gran variedad de tipos celulares, en los que normalmente no se replican virus de baja patogenicidad, que tienen pocos aminoácidos básicos en el sitio de rompimiento, por lo que son sensibles sólo a la acción de enzimas similares a la tripsina, presente en las células epiteliales de los tractos respiratorio y gastrointestinal (Rott, 1992; Webster *et al.* 1992).

Con base en los datos de epidemiología molecular, los virus mexicanos de baja patogenicidad, circularon en las aves comerciales durante varios meses antes de que ocurriera la mutación que les dio la característica de AP. Esta mutación produjo un aumento en el rompimiento de la hemoaglutinina por proteasas intracelulares debido a la sustitución de lisina por glutamina en la posición -3 de los aminoácidos de la HA1 y a la inserción de dos aminoácidos básicos (arginina y lisina) en la posición -5 del mismo fragmento (García, M. *et al.* 1996). En contraste el virus A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) de BP, contenía varios aminoácidos básicos en el sitio de rompimiento, pero la característica de AP la adquirió al perder el sitio de glicosilación en el residuo -13 de la HA1. La presencia de este cambio molecular en el sitio de rompimiento provocó la producción de partículas virales de alta patogenicidad, por el mecanismo antes descrito (Brugh and Perdue, 1991).

La muerte de las Av-Susc, que ocurrió posterior a la primera detección del virus en sangre(28 hpi)

(Figura 13), pudo ser el resultado del daño a centros vitales, lo que aunado a la replicación viral y el desarrollo de lesiones, pueden producir la muerte de forma aguda o sobreaguda, especialmente cuando se ve afectado el músculo cardíaco, arteriolas, capilares sanguíneos, el centro respiratorio en el encéfalo, las glándulas adrenales y la hipófisis.<sup>1</sup>

Los cambios patológicos macroscópicos que se observaron en las Av-Susc, después de la inoculación con el virus, coincidieron con los que han sido reportados por otros autores tanto en inoculaciones experimentales como en brotes de campo de virus de AP ( Brown *et al.*, 1992; Casaubon *et al.*, 1996; Easterdar y Hinshaw, 1991; Harley *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1995a; Hooper, 1989, Mo *et al.*, 1997; Monroy *et al.*, 1995; Van Campen *et al.*, 1989). La evaluación de las lesiones microscópicas, a través de un método numérico (MHL), permitió cuantificar de una manera más precisa el efecto del virus sobre los tejidos, ya que se consideró la severidad, extensión y cantidad de las lesiones. Algunos autores han usado métodos numéricos de evaluación de lesiones, que únicamente toman en cuenta la severidad, o la extensión, o la cantidad de las lesiones, pero no el conjunto de las tres características (Swayne y Slemons, 1992; Swayne *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Mo *et al.* 1997).

Los hallazgos histopatológicos demostraron que la vacunación disminuyó sustancialmente la severidad de las lesiones. En general las lesiones encontradas en las Av-Inm fueron menos severas y numerosas, que aquellas que se presentaron en las Av-Susc.

Dentro de los cambios patológicos más significativos, se mencionan los del tejido linfoide, que en ambos grupos consistieron en despoblación linfoide en la que se aprecia apoptosis de los linfocitos de la zona cortical del timo, asociada a hemorragias e infiltración de heterófilos (Cuadro 10) (Figuras 17 y 18). En las Av-Susc también se presentó despoblación linfoide de la zona medular (linfoblastos), que no fue observada en las Av-Inm, lo que indica que estas últimas las aves tuvieron la oportunidad de desarrollar una respuesta anamnésica ante la presencia del virus. Por el contrario, las Av-Susc, desarrollaron atrofia y despoblación linfoide del timo cada vez más severa conforme pasaron las hpi (Figura 9)

El daño al tejido linfoide por parte de los virus de AP, ha sido plenamente estudiado. Van Campen *et al.* (1989), demostraron que en pollos Leghorn de 10 semanas de edad, inoculados intratraquealmente con  $10^3$  DLEP<sub>50</sub> del virus A/Turkey/Ontario/7732/66 (H5N9), presentaron daño severo en el tejido linfoide, asociado a altos títulos virales en el tejido. Este virus también afectó a los linfocitos circulantes. Ambos efectos fueron responsables de linfopenia severa y sostenida hasta la muerte de los animales. También los

---

<sup>1</sup> D.E. Swayne, comunicación personal

virus A/Chicken/Victoria/A 185/85 (H7N7), A/Chicken/Victoria/85 (H7N7), A/Chicken/Victoria/92 (H7N3) y A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2), tienen un efecto marcado sobre el tejido linfóide (Hooper, 1989; Hooper *et al.*, 1995; Mo *et al.*, 1997).

La apoptosis es una forma de muerte celular definida con base en criterios morfológicos y bioquímicos. Morfológicamente, la célula se contrae y se vuelve densa, la cromatina se condensa y es empacada dentro de la membrana nuclear (picnosis), el núcleo puede sufrir cariorrexis o simplemente la célula se contrae y forma una masa redonda denominada cuerpo apoptótico (Hockenbery, 1995; Kane, 1995; Majno y Joris, 1995). Bioquímicamente, el DNA celular se fragmenta en múltiples segmentos de aproximadamente 185 pares de bases (Majno y Joris, 1995). Schultz-Cherry *et al.* (1997), señalan que la apoptosis linfóide causada por el virus de influenza está relacionada a la activación de un factor celular por parte del virus y a la expresión de una proteína viral. En estudios *in vivo* demostraron que durante las fases tempranas de la infección del virus de influenza, hay un incremento en la actividad del TGF- $\beta$  (transforming grown factor- $\beta$ ) que provoca apoptosis. Estos mismos investigadores, en estudios *in vitro*, comprobaron que los anticuerpos neutralizantes contra TGF- $\beta$ , inhiben parcialmente la apoptosis inducida por el virus. Así mismo, usando células en las cuales la expresión de proteínas virales está regulada por tetraciclinas, encontraron que la expresión de la proteína no estructural 1 (NS1) es suficiente para inducir apoptosis.

En el caso de otros virus que afectan a las aves, se ha informado que el virus de la enfermedad de Newcastle, también induce apoptosis en fibroblastos de embrión de pollo y en células mononucleares de sangre periférica (Lam, 1995; Lam, 1996). Las características de la apoptosis inducida por el virus de Newcastle (presencia de cromatina condensada y de cuerpos apoptóticos) son semejantes a las observadas en el presente estudio con el virus de IA. Estas dos características han sido reportadas en la literatura como específicas de apoptosis (Kane, 1995; Guido y Joris, 1995) (Fotos 17 y 18).

Algunos cambios observados en la bolsa de Fabricio y en algunas partes del tracto gastrointestinal, en ambos grupos de aves, pudieron ser el resultado de la presencia de algún factor tóxico en el alimento, ya que correspondieron a un proceso crónico (fibrosis, atrofia e hiperplasia epitelial), debido a que las aves consumieron el mismo alimento comercial durante toda la fase experimental. Aunque, la necrosis linfóide en la bolsa de Fabricio, ha sido reportada como específica de la infección de virus de AP (Hooper, 1989; Van Campen *et al.*, 1989; Hooper *et al.*, 1995).

Las lesiones macroscópicas observadas en la cresta de las Av-Susc, también se presentaron en barbillas, metatarsos, dedos y cojinete plantar. Los cambios patológicos microscópicos en la cresta,

comenzaron a notarse a partir de las 28 hpi, momento que coincidió con la primera detección del virus en sangre (Figura 13). La severidad, extensión y cantidad de las lesiones, alcanzó una MHL de 18 a partir de las 52 hpi (Figura 12). En el estudio microscópico, se observó hiperemia severa en los capilares subepidérmicos, asociada a áreas de necrosis y presencia de glóbulos rojos lisados (glóbulos rojos desnudos); también se observó gran cantidad de exudado serohemorrágico en el tejido conjuntivo (Figuras 19 y 20). Casaubon *et al.*, (1996), al estudiar las lesiones cutáneas producidas por el virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) mediante microscopía electrónica, observaron grandes acúmulos de virus en el interior de extensas cisternas en el citoplasma de células endoteliales, heterófilos, linfocitos y fibroblastos. Las células infectadas se observaron tumefactas, con los organelos desordenados, las mitocondrias dilatadas y grumos de heterocromatina en el núcleo; sugiriendo que uno de los mecanismos que más participan en la patogenia de la enfermedad es el daño vascular, que provoca producción de abundante exudado serohemorrágico, hemoconcentración local, estasis vascular que induce lisis de glóbulos rojos y necrosis por isquemia.

La falta de detección del virus en los tejidos, a pesar de haber empleado diferentes anticuerpos, complejos de avidina-biotina-peroxidasa y sistemas de amplificación de biotina-estreptavidina-fosfatasa alcalina en la técnica de inmunohistoquímica, pudo haber sido obstaculizada por diferentes factores, siendo uno de los principales, la baja concentración del antígeno viral en los tejidos. Swayne<sup>2</sup>, señala que para poder identificar mediante inmunohistoquímica al virus, se requiere por lo menos de  $10^5$  partículas virales/g de tejido después del proceso de inclusión de los órganos en parafina, lo que representa que la cantidad de virus inicial en el órgano tiene que estar muy por arriba de esta cantidad.

En la presente investigación la cantidad de virus circulante en la sangre fue incrementándose hasta las 68 hpi, sin alcanzar más de 200 millones de DLEP<sub>50</sub>/ml, lo cual refleja que la cantidad de partículas virales en los tejidos era escasa, ya que el virus circulante es el resultado de la replicación viral en diferentes órganos. Fue hasta las 72 hpi, cuando la viremia alcanzó cerca de 1,200 millones de DLEP<sub>50</sub>/ml, es decir seis veces más que a las 68 hpi (Figura 14). El virus circulante fue resultado de una posible replicación inicial en las glándulas salivales palatinas (Figuras 15 y 16), cornetes nasales, senos nasales o incluso los pulmones, sin dejar de considerar que también pudo existir una replicación inicial en el tracto gastrointestinal, ya que aunque las aves fueron inoculadas por vía intranasal, el inóculo pudo ser tragado, lo que ocurre en forma natural cuando las aves se infectan con aerosoles o agua contaminada.

Finalmente uno de los factores que más pudo influir en la no detección del virus a través de

---

<sup>2</sup> D.E. Swayne, comunicación personal

inmunohistoquímica, fue el corto tiempo de muestreo (72 hrs), ya que en la mayoría de trabajos publicados el tiempo de muestreo va de los tres a los ocho días (Slemons y Swayne, 1990; Brown *et al.*, 1992; Shalaby *et al.*, 1994; Swayne y Slemons, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Mo *et al.*, 1997).

En un estudio realizado por Mo *et al.* (1997), donde se inocularon aves con cinco virus de influenza, tanto de AP como de BP, se encontró que cuatro de los cinco virus pudieron ser detectados mediante la técnica de inmunohistoquímica, pero en las aves inoculadas con el virus A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8), no se pudo detectar la presencia del virus a pesar de que hubo evidencia serológica de infección, lo cual fue atribuido a una falta de persistencia del virus en los tejidos. En el caso de los virus A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2), A/Chicken/Victoria/85 (H7N7) y A/Turkey/Ontario/7732/66, todas de AP, el antígeno viral fue demostrado con mayor frecuencia en el corazón, encéfalo, pulmones, riñones y páncreas. Los sitios específicos de replicación viral, estuvieron asociados a lesiones de tipo degenerativo y necrosis. Adicionalmente, la frecuencia y severidad de las lesiones, varió dependiendo del virus, a pesar de que los tres virus fueron inoculados por la misma vía y a una dosis similar ( $10^{4.1}$  -  $10^{4.3}$  DLEP<sub>50</sub>). En este mismo estudio, donde se emplearon pollos jóvenes, el sitio de replicación principal de los tres virus, fueron las células del parénquima de varios órganos, incluyendo neuronas y células endoteliales del encéfalo, miocitos cardíacos, células epiteliales de los acinos pancreáticos, células de los túbulos renales y neumocitos. Sin embargo, se observó poca antígeno en el endotelio de los capilares

En un estudio anterior (Brown *et al.* 1992), inocularon gallinas de un año y pollos de 15 semanas, vía saco aéreo caudal, con  $10^{3.7}$  DLEP<sub>50</sub> del virus A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) de alta patogenicidad, encontrando diferencia en la presentación clínica de la enfermedad y en la distribución de los sitios de replicación viral. En el grupo de aves adultas, la presentación clínica de la enfermedad fue caracterizada como aguda o sobreaguda, con algunas muertes antes de las 48 hpi. Las lesiones características fueron las hemorragias y el edema subcutáneo. El patrón de distribución del virus en los tejidos, determinado por inmunohistoquímica, sugirió que hubo una primera fase de replicación en las células epiteliales del saco aéreo, seguido de una diseminación al endotelio de los capilares del mismo y posteriormente hacia todos los capilares del organismo. Los resultados de inmunohistoquímica, revelaron que la afección del endotelio capilar, fue más intensa y extensa en el tejido subcutáneo, específicamente de la cresta y las barbillas. En esas dos áreas, hubo una pérdida de la integridad vascular, asociada a una alta concentración del antígeno viral. En otros órganos, como el encéfalo, corazón, pulmón, tráquea, hígado, riñón, páncreas, ovario, bazo, timo y bolsa de Fabricio, también hubo afección capilar. Consecuentemente, se pudo determinar que la muerte de las aves, fue atribuida a un colapso vascular generalizado, como resultado de la pérdida de fluidos a través de los capilares dañados. Así mismo, señalan que en los tejidos

de pollos jóvenes la replicación del virus de AP es menor que en los tejidos de animales adultos, ya que la tinción inmunoespecífica fue mucho menor en todos los tejidos, independientemente de que las aves fueron inoculadas por la misma vía y con la misma cantidad de virus.

Kobayashi *et al.* (1996), al evaluar los efectos de los virus de AP A/Chicken/Victoria/1/85 (H7N7), A/Turkey/England/50-92/91 (H5N1) y A/Tern/South Africa/61 (H5N3), en el encéfalo de pollos de seis semanas, encontraron gliosis y necrosis focal, endoteliosis vascular e infiltración de células mononucleares alrededor de los vasos sanguíneos (descrita como vasculitis), meningitis, ventriculitis con necrosis de células endociliales. Las lesiones estuvieron asociadas con el aislamiento del virus a partir del encéfalo y la detección de las proteínas virales en las células piramidales, endociliales, células de la glia y endotelio vascular. Estos autores, concluyeron que la distribución focal de la replicación viral y la muerte de ciertas neuronas o la replicación masiva y la necrosis del endotelio vascular, con formación de trombos, puede ser uno de los mecanismos responsables del desarrollo de la enfermedad y muerte de los animales.

En general, la muerte de los animales infectados por virus de alta patogenicidad, ha sido atribuida a daño directo al músculo cardíaco y encéfalo, hipercalemia por necrosis tisular generalizada, colapso cardiovascular, necrosis generalizada del endotelio vascular, vasculitis, trombosis, coagulación intravascular diseminada, colapso respiratorio y alteración de las glándulas endócrinas (Brown *et al.*, 1992; Hooper, 1989; Hooper *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1996; Mo *et al.*, 1997). Una falla renal aguda acompañada de uremia, hipercalcemia e hiperfosfatemia, puede también ser causa de muerte (Swayne *et al.*, 1994), ya que los riñones son un sitio importante para la producción de lesiones y la replicación viral (Slemons y Swayne, 1990; Slemons *et al.*, 1990; Swayne y Slemons, 1992; Swayne *et al.*, 1994; Swayne y Slemons, 1994; Shalaby *et al.*, 1994; Hooper *et al.*, 1995; Slemons y Swayne, 1995; Mo *et al.*, 1997).

En la presente investigación se puede concluir que la inoculación de Av-Susc y de Av-Inm, con un virus de IA de alta patogenicidad aislado en México, por vía intranasal, simulando una ruta natural de exposición, resultó en la presentación de dos formas de la enfermedad. Las Av-Susc mostraron signos clínicos, mortalidad y fue detectado virus circulante en sangre a partir de las 28 hpi, lo que sugiere que a partir de ese momento el virus puede infectar cualquier órgano y tipo celular. Las Av-Inm no mostraron signos clínicos ni mortalidad después de la infección con el virus de AP y a pesar de que hubo lesiones a nivel microscópico, éstas fueron generalmente menos severas que en las Av-Susc e incluso la cresta no presentó lesiones; así mismo, éstas aves no presentaron viremia. El virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) de alta patogenicidad produce apoptosis linfocítica severa y en las Av-Susc el daño al endotelio capilar producido por el virus, puede ser uno de los mecanismos responsables de la muerte de los animales

al desencadenar un colapso vascular generalizado. La inmunidad conferida por la vacuna emulsionada contra IA, protegió a las aves de la presentación de signos clínicos y mortalidad, debido a que evitó la viremia en las aves vacunadas con lo que el virus no pudo causar daño en centros vitales del ave.

También, se necesario realizar un estudio en donde se utilicen técnicas de citometría de flujo, microscopía electrónica y estudio del DNA celular, para evaluar de una manera más precisa la apoptosis producida por el virus. Es necesario evaluar la respuesta inmune celular generada por las vacunas emulsionadas, para conocer el mecanismo por el cual se evita la viremia y realizar un estudio en donde se evalúe si los virus de BP son capaces de producir viremia, para saber si el aislamiento viral a partir de muestras sanguíneas puede ser considerado una forma sencilla, práctica y confiable de diferenciar virus de influenza que replican en forma localizada en el tracto respiratorio y gastrointestinal de aquellos que tienen la capacidad de diseminarse a todos los órganos del ave a través de la sangre e implementar en los laboratorios de diagnóstico el aislamiento viral a partir de muestras sanguíneas, ya que si la muestra se toma directamente del corazón en forma aséptica, no es necesario utilizar filtros o agregar antibióticos, debido a que la inoculación de los embriones puede realizarse directamente con la sangre, con lo que se reduce el costo y tiempo de procesamiento.

## 5.- LITERATURA CITADA

1. Alexander, J.D., Wood, W.G., Collins, S.M., Banks, J., and Manvell, J.R. Recent work on the pathogenicity of avian influenza viruses and the pathogenicity and antigenicity of Newcastle disease virus. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 1-4. ANECA, WPDC.
2. Boletín Informativo sobre la Influenza Aviar en México. Coordinación del Operativo de Control y Erradicación de la Influenza Aviar. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Salud Animal. Números 1 a 24, junio de 1994 a marzo de 1996.
3. Brown, C.C., Olander, H. J., and Senne, D. A. A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using immunohistochemistry. *J. Comp. Path.* 107: 341-348 (1992)
4. Brugh, M., and Perdue, M.L. Emergence of highly pathogenic virus during selective chicken passage of the prototype mildly pathogenic Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. *Avian Diseases* 35: 824-833 (1991)
5. Campos, L.H., Rivera, C.E., and Irastorza, E.M. Situación y perspectivas del programa de erradicación de la Influenza Aviar en México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 13-16 ANECA, WPDC
6. Casaubon, H. M., Hernández, M. A., García, G. J., and Rosales, M. L. Estudio morfológico y consideraciones sobre la evolución de las lesiones cutáneas causadas por 5 aislamientos de virus de Influenza Aviar (IA) en México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 48-50 ANECA, WPDC
7. Cerón, H.M., Rodríguez, V.H., Hernández, M.A., Blasco, R.K., García, G.J., and Webster, G.R. Estudios básicos de las cepas de desafío del virus de influenza aviar y evaluación de la prueba de patogenicidad. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 50-51 ANECA, WPDC
8. Connor, J. R., Kawoaka, Y., Webster, G. R., and Paulson, C. J. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 205: 17-23 (1994)
9. Easterday, C.B., and Hinshaw, S.V. Influenza. In: Diseases of Poultry. Edited by: Calnek, W.B., Barnes, W.C., Reid, M.W., and Yorder, W.H. 523-551 Iowa State University Press, Ames Iowa, USA 1991.



10. Estudillo, L.J. Consideraciones sobre el instinto migratorio de las aves silvestres y análisis de las posibilidades reales que éstas hayan sido el vector del brote de Influenza Aviar en México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 22-30 ANECA, WPDC
11. García, G. J., Hernández, M. A., and Rodríguez, V. H. Factores de patogenicidad e inmunización contra Influenza Aviar. Memorias de la XX Convención Anual ANECA. Acapulco, Guerrero. Mayo de 1995. p. 397-404. ANECA
12. García, G. J., Rodríguez, V. H., Hernández, M. A., and Cerón, H. M. Vacunas contra Influenza Aviar. Memorias del curso Bioseguridad para el control y prevención de la Influenza Aviar. México, D.F. Octubre de 1995. p. 27-35. ANECA
13. García, G. J., Méndez, M. A., and Rivera, C. E. Estudio descriptivo de los aislamientos del virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad de enero a septiembre de 1994. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2: 100 (1995)
14. García, G. J., Rodríguez, V. H., Hernández, M. A., Cerón, H. M., Alvarado, M. and Gómez, D. C. Utilización de formalina como inactivante en la vacuna de Influenza Aviar. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2: 103 (1995)
15. García, G.J., Rodríguez, V.H., Hernández, M.A., Cerón, H.M. and Blasco, R.K. Evaluación de vacunas inactivadas de IA en México, pruebas de laboratorio y de campo. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 40-42 ANECA, WPDC
16. García, M., Crawford, M.J., Rivera, C.E., and Perdue, L.M. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.* 77: 1493-1504 (1996)
17. Harley, V. R., Hudson, P. J., Coupar, B. E., Selleck, P. W., Westburg, H., and Boyle, D. B. Vaccinia virus expression and sequence of an avian influenza nucleoprotein gene: potencial use in diagnosis. *Arch Virol* 113: 133-141 (1990)
18. Hernández, M. A., Rodríguez, V. H., Rivera, C. E. and García, G. J. Evaluación de una vacuna comercial emulsionada contra Influenza Aviar. Memorias V Jornada Médico Avícola. México, D.F., abril de 1995. p. 59-62. FMVZ, UNAM.
19. Hernández, M. A., Rodríguez, V. H. and García, G. J. protección conferida por una vacuna emulsionada

- ante el desafío de una cepa altamente virulenta de Influenza Aviar (H5N2). *Vet. Méx.* 26, suplemento 2: 104 (1995)
20. Hernández, M.A., Casaubon, H.T., Aspargilla, S.M., and García, G.J. Evaluación de la virulencia de un virus de Influenza Aviar (H5N2) aislado de codornices (*Coturnix coturnix japonica*) con signos nerviosos y alta mortalidad. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 46-48 ANECA, WPDC
21. Hernández, M.A., Cerón, H.M., Rodríguez, V.H., and García, G.J. Protección por cuatro vacunas de Influenza Aviar (H5N2) en codornices (*Coturnix coturnix japonica*). Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 296-298 ANECA, WPDC
22. Hockenbery, D. Defining apoptosis. *American Journal of Pathology* 146: 16-19 (1995)
23. Hooper, P. T. Lesions in chickens experimentally infected with 1985 H7N7 avian influenza virus. *Aust. Vet. J.* 66: 155-156 (1989)
24. Hooper, P.T., Russell, G.W., Selleck, P.W., and Stanislawek, W.L. Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Diseases* 39: 458-464 (1995)
25. Kane, A.B. Redefining cell death. *American Journal of Pathology* 146: 1-2 (1995)
26. Kingsburry, W.D. Orthomyxoviridae and Their Replication. In: *Virology*, Second Edition, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New York, 1990.
27. Kobayashi, Y., Horimoto, T., Kawoaka, Y., Alexander, D.J., and Itakura, C. Neurophatological studies of chicken infected with highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Comp. Path.* 114: 131-147 (1996) virus infection on the phagocytic function of systemic phagocytes and pulmonary macrophages of turkeys. *Avian Diseases* 38: 93-102 (1994)
28. Kodihalli, S., Sivanandan, V., Nagaraja, K.V., Shaw, D., and Halvorson, D.A. Effect of avian influenza virus infection on the phagocytic function of systemic phagocytes and pulmonary macrophages of turkeys. *Avian Diseases* 38: 93-102 (1994)
29. Lam, K.M. Apoptosis in chickens embryo fibroblasts caused by Newcastle disease virus. *Veterinary Microbiology* 47: 357-363 (1995)
30. Lam, K.M. Newcastle disease virus-induced apoptosis in the peripheral blood mononuclear cells in

chickens. *J. Comp. Path.* 114: 63-71 (1996)

31. Latithakunjamma, C. R., and Mini, M. Pathology of the chick embryo infected with influenza virus. *J. Vet. Anim. Sci.* 22 (2): 93-94 (1991)
32. Majno, G., and Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis . An overview of cell death. *American Journal of Pathology* 146: 3-15 (1995)
33. Mo, I.P., Brugh, M., Fletcher, O.J., Rowland, G.N., and Swayne, D.E. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. *Avian Diseases* 41: 125-136 (1997)
34. Monroy, B. J., González, S. D., Hernández, M. A., and García, G. J. Estudio diferencial de signos clínicos y lesiones producidas por dos cepas de virus altamente patógeno de Influenza Aviar en tres estirpes de pollos. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2: 101 (1995)
35. Murphy, R.B. and Webster, G.R. Orthomyxoviruses. In *Virology, Second Edition*, Edited by: Fields, L.N., and Knipe, D.M. Raven Press, Ltd. New York, 1990.
36. Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Influenza Aviar. Diario Oficial de la Federación. 14 de agosto de 1996
37. Palacios, M.R., Rodríguez, V.H., Cerón, H.M., and García, G.J. Evaluación de 7 vacunas comerciales de Influenza Aviar. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 38-40 ANECA, WPDC
38. Perdue, L.M., García, M., Crawford, J., and Latimer, J. Heterogeneidad en la proteína de la hemoaglutinina entre aislamientos del virus de la influenza aviar H5N2 procedentes del centro de México. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 8-13 ANECA, WPDC
39. Reed, L.J., and Muench, H. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Journal of Hygiene* 27: 493-497 (1938)
40. Rodríguez, V. H., Beltrán, R. J., Diosdado, V. F., Soccí, E. G., Morilla, G. A., and García, G. J. Estudio comparativo sobre la eficiencia de la aplicación de la vacuna de Influenza Aviar en pollos al día de edad y a los 8 días de edad. *Vet. Méx.* 26, suplemento 2: 105 (1995)

41. Rodríguez, V.H., Cerón, H.M., Palacios, M.R., Hernández, M.A., Gómez, D.C., and García, G.J. Protección conferida por vacunas de Influenza Aviar inactivadas con formalina, b-propiolactona y etilenimina binaria. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 307-309 ANECA WPDC
42. Rodríguez, V.H., Beltrán, R.J., Socci, E.G., Hernández, M.A., Diosdado, V.F., and García, G.J. Estudio comparativo de la vacunación contra Influenza Aviar en pollo de engorda al día y a los ocho días de edad. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 367-369 ANECA WPDC
43. Rott, R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Veterinary Microbiology* 33: 303-310 (1992)
44. Schultz-Cherry, S., Dybdahl-Sissoko, N., Krug, R., and Hinshaw, V.S. Viral and cellular factors involved in influenza virus-induced apoptosis. Abstracts of the Fourth International Symposium on Avian Influenza. Athens, Georgia. Mayo 28-31, 1997.
45. Senne, A.D., Rivera, C.E., Panigrahy, B., Fraire, M., Kawaoka, Y., and Webster, G.R. Characterization of avian influenza H5N2 isolates recovered from chickens in Mexico. Memorias de la XXI Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y la 45<sup>th</sup> Western poultry Disease Conference. Cancún, Q.R. Mayo de 1996. p. 5-8 ANECA, WPDC
46. Shalaby, A.A., Slemons, R.D., and Swayne, D.E. Pathological studies of A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8) influenza virus in specific-pathogen-free laying hens. *Avian Diseases* 38: 22-32 (1994)
47. Slemons, R.D., Johnson, J.C., Osborn, J.S., and Hayes, F. Type A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Diseases* 18: 119-125 (1974)
48. Slemons, R. D., Locke, L. N., Sheerar, G. M., Duncan, R. M., Hinshaw, S. V., and Easterday, B. C. Kidney lesions associated with mortality in chickens inoculated with waterfowl influenza viruses. *Avian Diseases* 34: 120-128 (1990)
49. Slemons, R.D., and Swayne, D.E. Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Diseases* 34: 277-284 (1990)
50. Slemons, R.D., and Swayne, D.E. Tissue tropisms and replicative properties of waterfowl-origin influenza viruses in chickens. *Avian Diseases* 39: 521-527 (1995)

51. Swayne, E. D., and Slemons, D. R. Evaluation of the kidney as a potential site of avian influenza virus persistence in chickens. *Avian Diseases* 36: 937-944 (1992)
52. Swayne, E. D., Radin, J. M., Hoepf, M., and Slemons, D. R. Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/Chicken/Alabama/7395/75 (H4N8). *Avian Diseases* 38: 151-157 (1994)
53. Swayne, D.E., and Slemons, R.D. Comparative pathology of a chicken-origen and two duck-origen influenza virus isolates in chickens: The effect of route of inoculation. *Vet. Pathol.* 31: 237-245 (1994)
54. Swayne, D.E., and Slemons, R.D. Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck- and turkey-origen type A influenza viruses in chickens. *Avian Diseases* 39: 74-84 (1995)
55. Van Campen, H., Easterday, C. B., and Hinshaw, S. V. Destruction of lymphocytes by a virulent avian influenza A virus. *J. gen. Virol.* 70: 467-472 (1989)
56. Vera, N. L. Aislamiento del virus de la Influenza A (Cepa A/pollo/Valle de Bravo/1994 (H5N2) a partir de pollo de engorda en el municipio de Valle de Bravo en coinfección con el virus de la Bronquitis Infecciosa. Tesis de Maestría. Fac. Med. Vet. y Zoo. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1995
57. Webster, G.R., Kawaoka, Y., Taylor, J., Weinberg, R., and Paoletti, E. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 9: 303-308 (1991).
58. Webster, G. R., Bean, J. W., Gorman, T. O., Chambers, M. T., and Kawoaka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56: 152-179 (1992)
59. Wood, G.W., Parsons, G., and Alexander, D.J. Replication of influenza A viruses of high and low pathogenicity for chickens at different sites in chickens and ducks following intranasal inoculation. *Avian Pathology* 24: 545-551 (1995)

**Cuadro 1.- Medias geométricas de los títulos de anticuerpos y porcentaje de seroconversión en aves inmunizadas con una vacuna inactivada contra influenza aviar**

Días post-vacunación	Media geométrica	% Seroconversión
0	n= 50 Neg.*	0
7	1:17	33
14	1:35	59
21	1:142	100

Neg.\*= negativo (sin títulos de anticuerpos contra influenza aviar)

**Cuadro 2. - Porcentajes de aves con lesiones en los cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPJ <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPJ n=18	52-72 HPJ n=18	2-24 HPJ n=21	28-48 HPJ n=18	52-72 HPJ n=18
SCPS <sup>D</sup>	14	0	0	33	28	17
Rinitis no supurativa	38	11	0	19	33	55
Rinitis hemorrágica no supurativa	0	50	100	0	0	11
Sinusitis no supurativa	24	11	67	19	39	5
Sinusitis hemorrágica no supurativa	0	39	5	0	0	0
Sinusitis supurativa	19	22	0	0	0	0
Adenitis no supurativa	52	44	28	5	11	11
Atrofia de las glándulas salivales	0	39	28	0	0	0

<sup>A</sup> Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup> HPJ= horas post-inoculación.

<sup>C</sup> n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup> SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 3.- Porcentajes de aves con lesiones en la laringe después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	14	5	17	67	56	44
Laringitis no supurativa	71	89	61	14	44	56
Necrosis unicelular dispersa (epitelio)	5	6	22	0	0	0
Hiperemia de la mucosa	14	0	0	5	0	0
Hemorragias	9	11	0	0	0	0
Heterofilia de la mucosa	9	11	5	5	0	0

<sup>A</sup> Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup> HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup> n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup> SCPS= sin cambios patológicos significativos.



**Cuadro 4. - Porcentajes de aves con lesiones en la tráquea después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

	<u>Aves susceptibles</u>			<u>Aves inmunizadas<sup>A</sup></u>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
Hallazgos histopatológicos						
SCPS <sup>D</sup>	95	22	55	86	94	78
Traqueítis no supurativa	5	78	39	14	5	22
Traqueítis hemorrágica no supurativa	0	0	6	0	0	0

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 5.- Porcentajes de aves con lesiones en los pulmones después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	43	33	33	33	22	33
Hiperplasia linfoide bronquial	14	28	39	33	78	67
Bronquitis no supurativa	24	33	0	33	0	0
Neumonía intersticial no supurativa focal	19	5	11	0	0	0
Neumonía intersticial no supurativa difusa	0	5	39	0	0	0

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 6.-** Porcentajes de aves con lesiones en el proventrículo después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	0	0	0
inflamación no supurativa de la mucosa	71	83	83	76	78	67
Adenoitis no supurativa	57	50	16	29	67	39
Descamación del epitelio glandular	71	50	100	76	67	89
Metaplasia del epitelio glandular	29	22	11	9	0	0
Dilatación glandular	52	50	33	43	39	55
Atrofia glandular	14	17	11	0	0	0
Atrofia de la mucosa	0	11	28	0	0	11

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 7.-** Porcentajes de aves con lesiones en el duodeno después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles <sup>A</sup>			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	74	83	95	59	89	83
Fusión de vellosidades	48	72	58	40	44	61
Edema subepitelial	52	36	39	55	70	70
Enteritis no supurativa	67	70	61	50	39	53
Necrosis unicelular dispersa (epitelio)	3	44	78	5	3	8
Heterofilia	19	14	3	26	20	5
Descamación epitelial	24	36	25	36	19	11

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 8. - Porcentajes de aves con lesiones en el páncreas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.**

Hallazgos histopatológicos	<u>Aves susceptibles</u>			<u>Aves inmunizadas<sup>A</sup></u>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	14	22	22	29	16	33
Granulos de zimógeno escasos	61	61	72	57	44	16
Presencia de acúmulos linfoides	66	50	22	57	72	55
Necrosis unicelular dispersa	14	5	11	9	11	5
Degeneración vacuolar	0	0	16	0	0	0

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el período correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 9. - Porcentajes de aves con lesiones en el ileon después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (HSN2) altamente patógeno.**

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	71	55	100	31	83	83
Enteritis no supurativa	48	78	33	19	73	66
Heterofilia	9	0	16	5	5	0
Necrosis epitelial dispersa	0	11	78	2	0	22
Edema en las puntas de las vellosidades	5	16	0	0	0	0
Fusión de vellosidades	33	83	72	19	55	83
Atrofia de la mucosa	71	44	72	38	72	66

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 10 .** Porcentajes de aves con lesiones en el timo después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	<u>Aves susceptibles</u>			<u>Aves inmunizadas<sup>A</sup></u>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	0	0	0
Hemorragias	81	94	100	91	100	78
Heterofilia	76	83	93	90	89	89
Apoptosis en la zona cortical	71	100	100	90	72	44
Despoblación linfoide medular	19	100	100	0	0	0
Atrofia	43	78	100	66	94	55

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el período correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 11.** - Porcentajes de aves con lesiones en las tonsilas cecales después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	11	3	0
Hemorragias	88	94	83	71	83	91
Hiperplasia linfoide	30	47	47	40	50	59
Apoptosis	26	41	41	26	36	16
Necrosis unicelular dispersa	0	30	80	7	11	22
Heterofilia	33	13	30	28	25	11

<sup>A</sup>Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup>HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup>n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup>SCPS= sin cambios patológicos significativos.



**Cuadro 12.** - Porcentajes de aves con lesiones en la bolsa después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	<u>Aves susceptibles</u>				<u>Aves inmunizadas<sup>A</sup></u>			
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia epitelial	100	100	100	100	100	100	100	100
Despoblación linfoide	100	100	100	100	100	100	100	100
Exudado leucocitario	43	38	33	76	38	38	38	44
Fibrosis	100	100	100	100	100	100	100	100

<sup>A</sup> Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

<sup>B</sup> HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup> n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup> SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Cuadro 13.** - Porcentajes de aves con lesiones en la cresta después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

Hallazgos histopatológicos	Aves susceptibles			Aves inmunizadas <sup>A</sup>		
	2-24 HPI <sup>B</sup> n=21 <sup>C</sup>	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18	2-24 HPI n=21	28-48 HPI n=18	52-72 HPI n=18
SCPS <sup>D</sup>	43	0	0	100	100	100
Infiltrado linfocitario	24	22	100	0	0	0
Hemorragias subepiteliales	5	16	100	0	0	0
Hiperemia subepitelial	24	72	100	0	0	0
Edema subepitelial	5	28	100	0	0	0
Heterofilia	0	67	100	0	0	0
Vacualización epitelial	0	39	100	0	0	0
Estasis sanguínea	0	44	100	0	0	0

<sup>A</sup> Inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

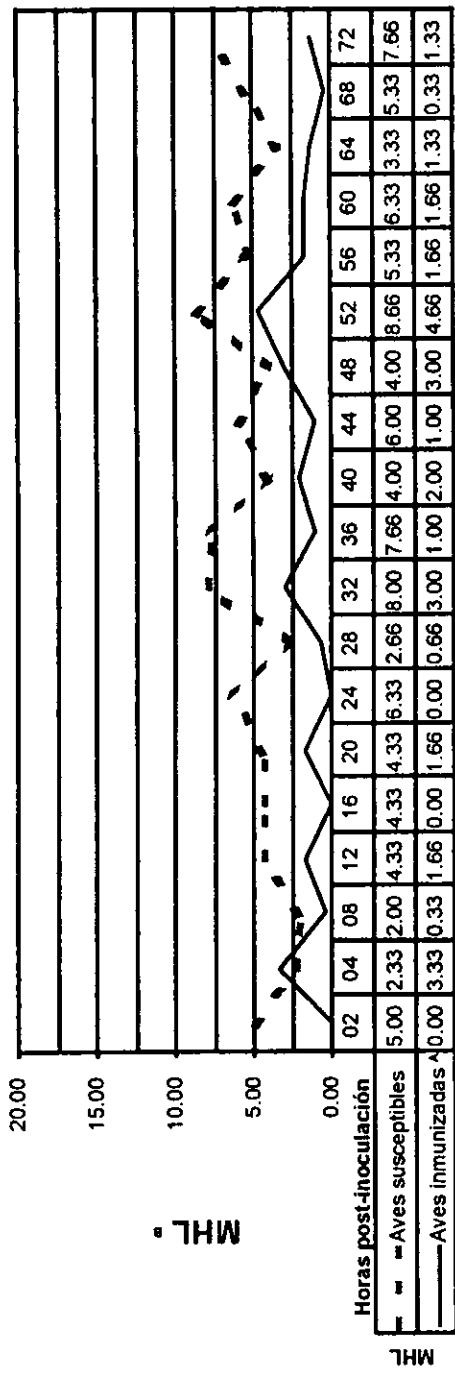
<sup>B</sup> HPI= horas post-inoculación.

<sup>C</sup> n= total de aves muestreadas con intervalos de 4 horas en el periodo correspondiente.

<sup>D</sup> SCPS= sin cambios patológicos significativos.

**Figura 1.-** Media histológica de lesiones en los cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

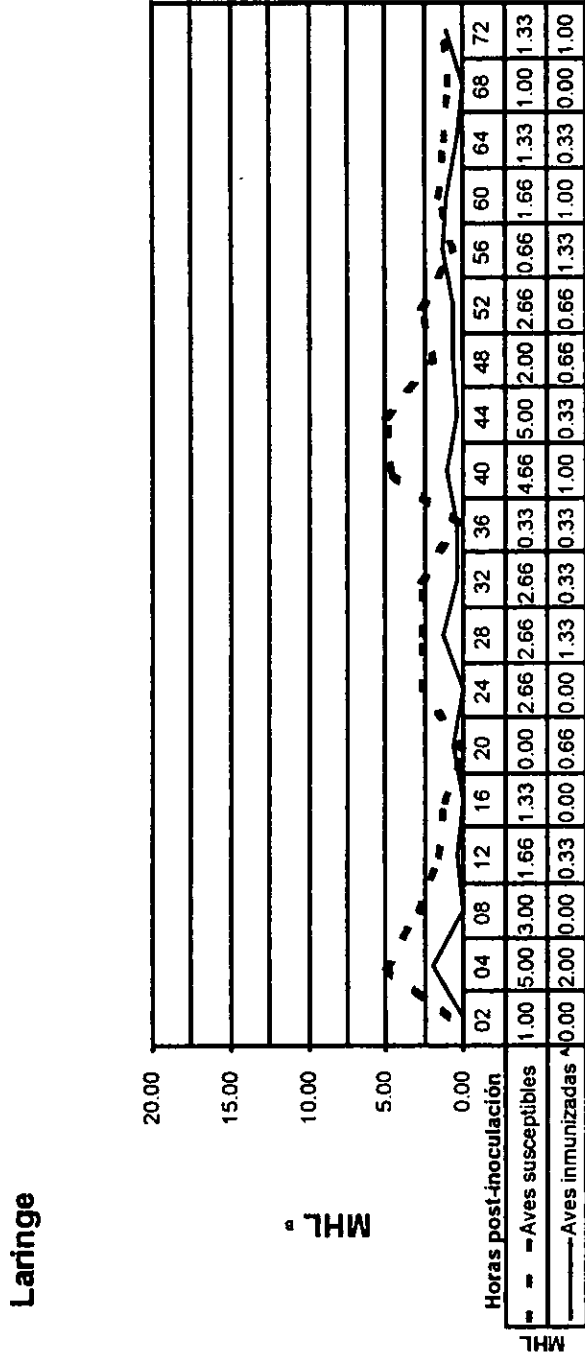
**Cornetes nasales, senos nasales y glándulas salivales**



A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

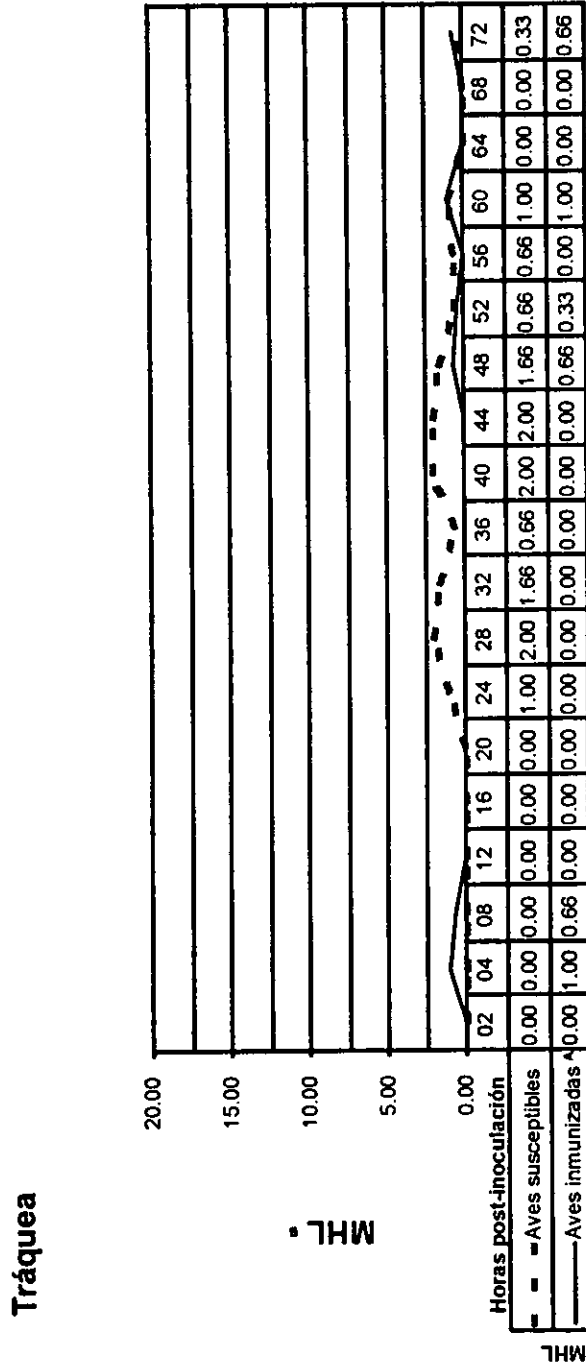
**Figura 2.-** Media histológica de lesiones en la laringe de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.



**A** Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

**B** MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 3.-** Media histológica de lesiones en la tráquea de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

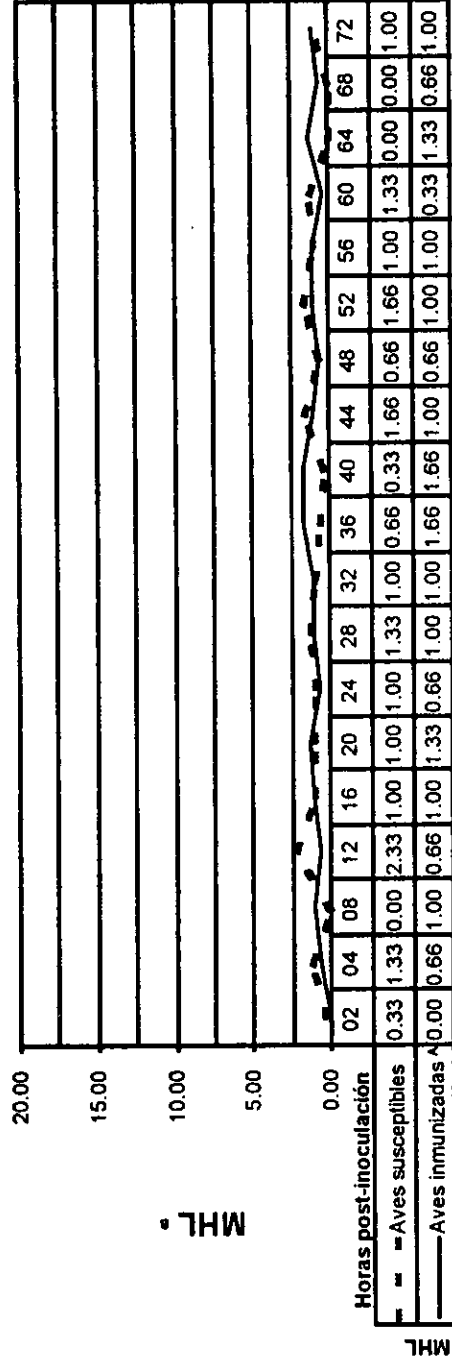


**A** Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

**B** MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 4.-** Media histológica de lesiones en el pulmón de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Pulmón**

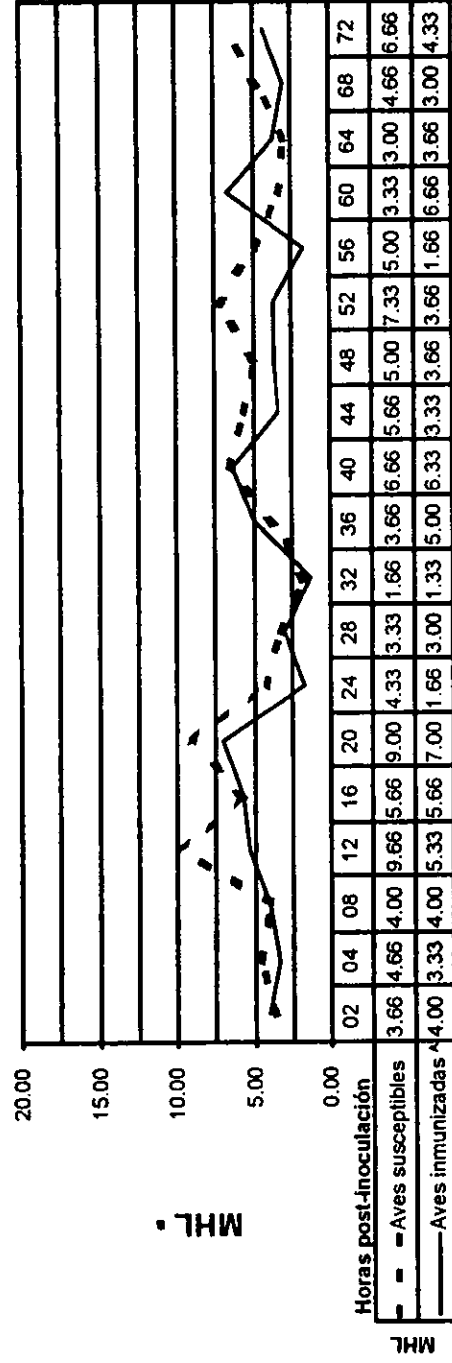


A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 5.-** Media histológica de lesiones en el proventrículo de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Proventrículo**

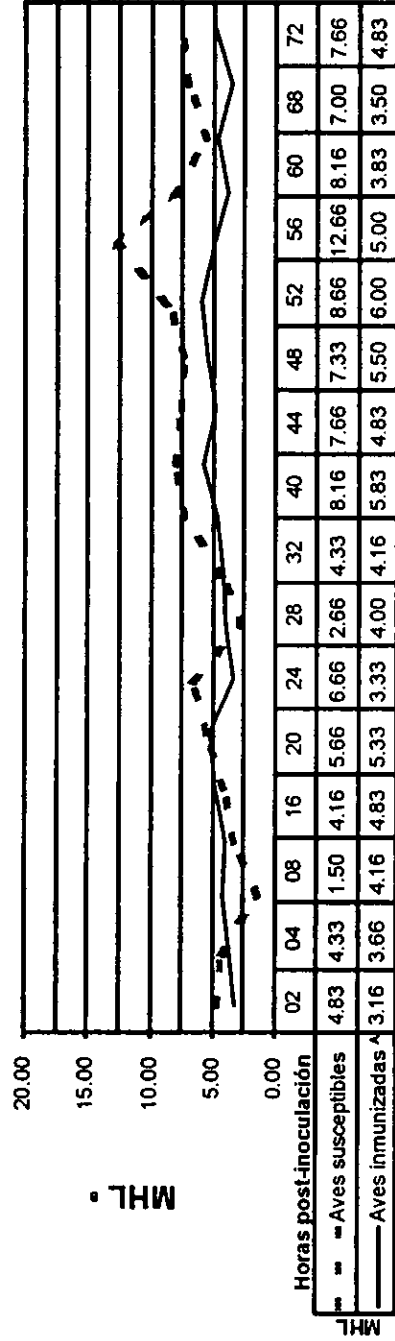


**A** Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

**B** MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 6.-** Media histológica de lesiones en el duodeno de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Duodeno**



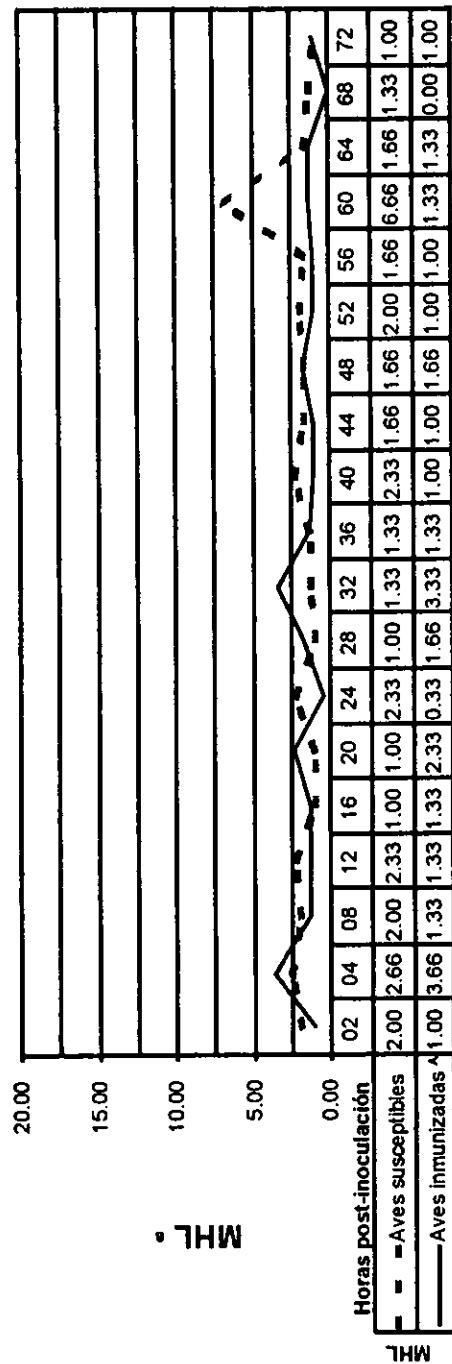
A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.



**Figura 7.-** Media histológica de lesiones en el páncreas de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Páncreas**

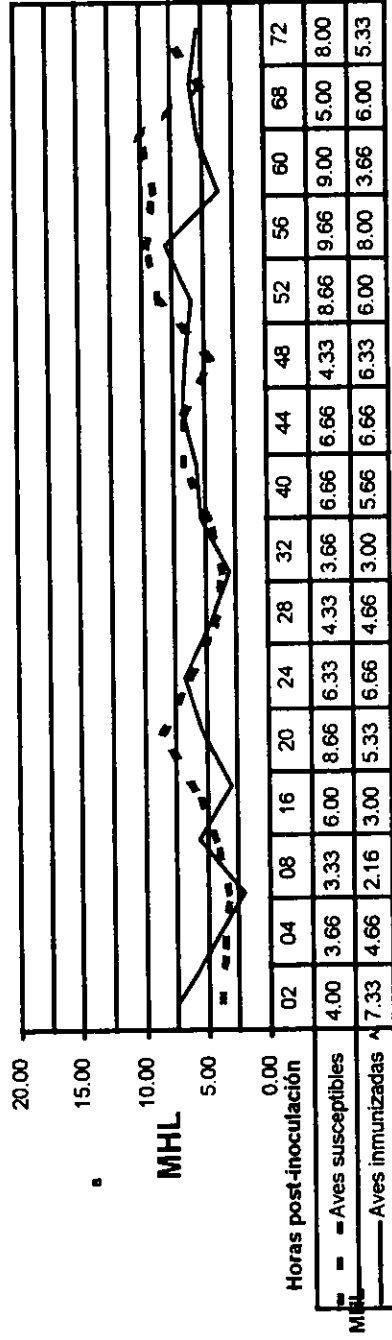


**A** Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

**B** MHIL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHIL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 8.-** Media histológica de lesiones en el ileon de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

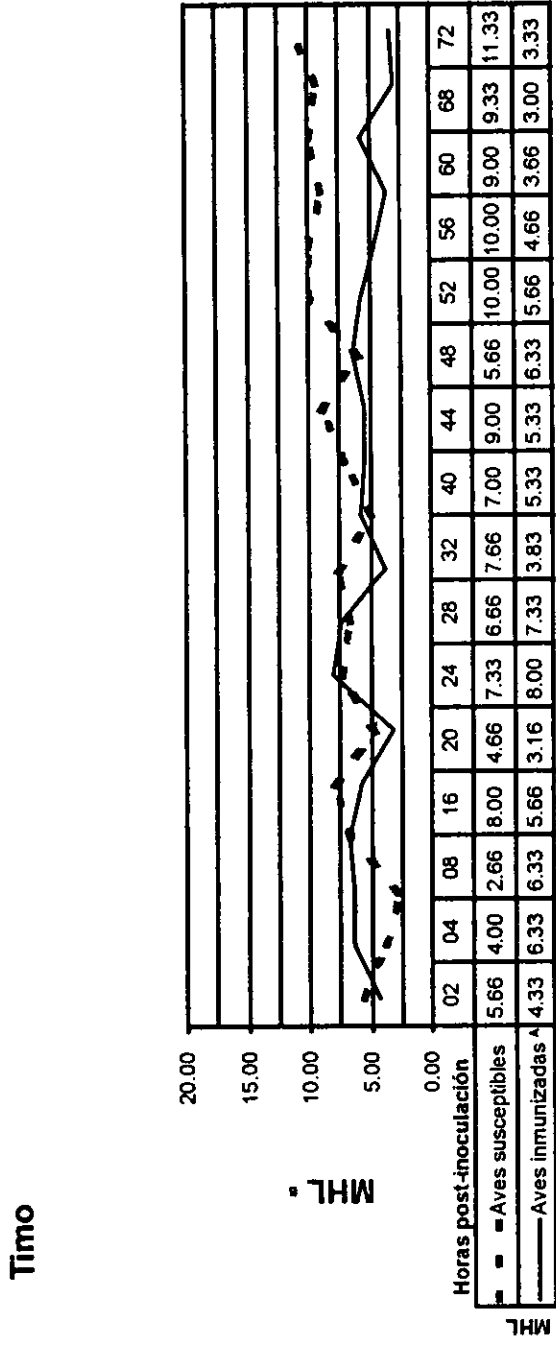
**ileon**



A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 9.-** Media histológica de lesiones en el timo de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

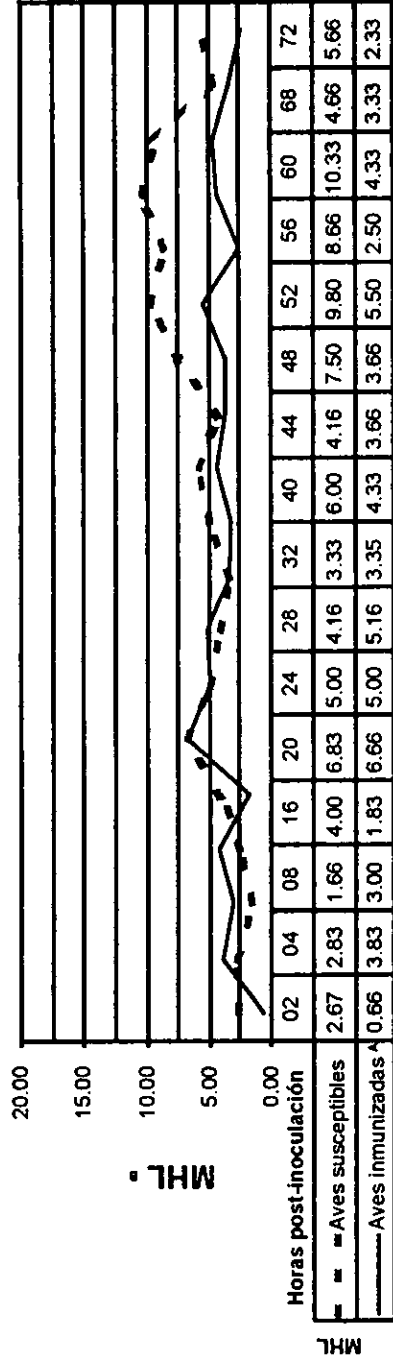


A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL = media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1 = leve, 2 = moderada, 3 = severa), extensión (1 = pequeña, 2 = moderada, 3 = amplia) y cantidad (1 = escasa, 2 = moderada, 3 = abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 10.-** Media histológica de lesiones en las tonsilas cecales de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

**Tonsilas cecales**

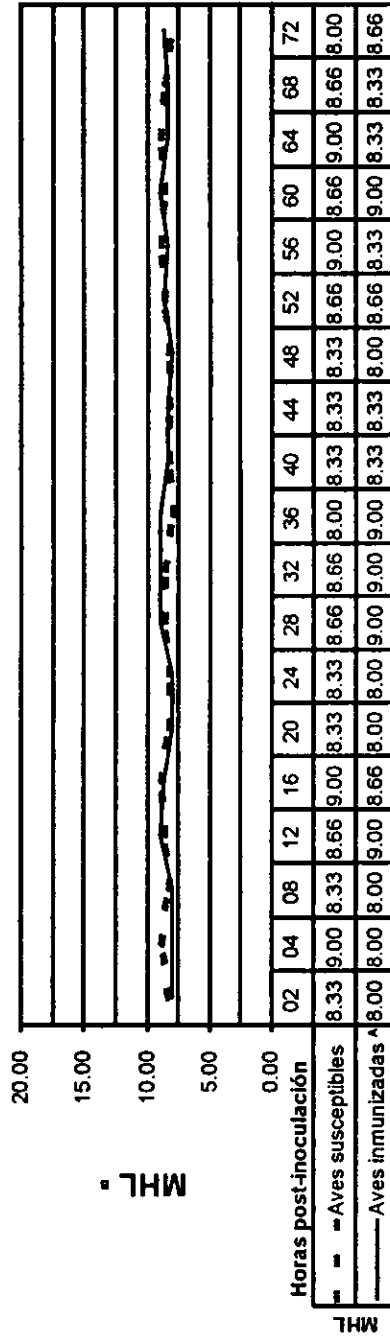


A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 11.-** Media histológica de lesiones en la bolsa de Fabricio de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.

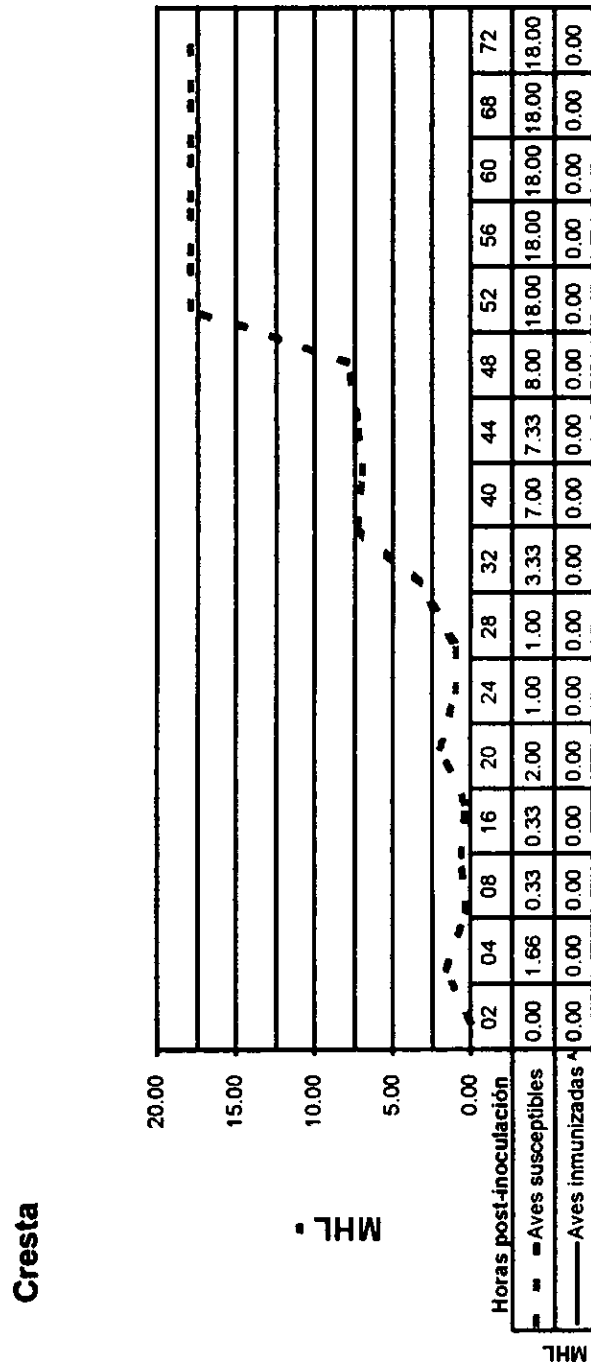
**Bolsa**



A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

B MHL= media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1= leve, 2= moderada, 3= severa), extensión (1= pequeña, 2= moderada, 3= amplia) y cantidad (1= escasa, 2= moderada, 3= abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

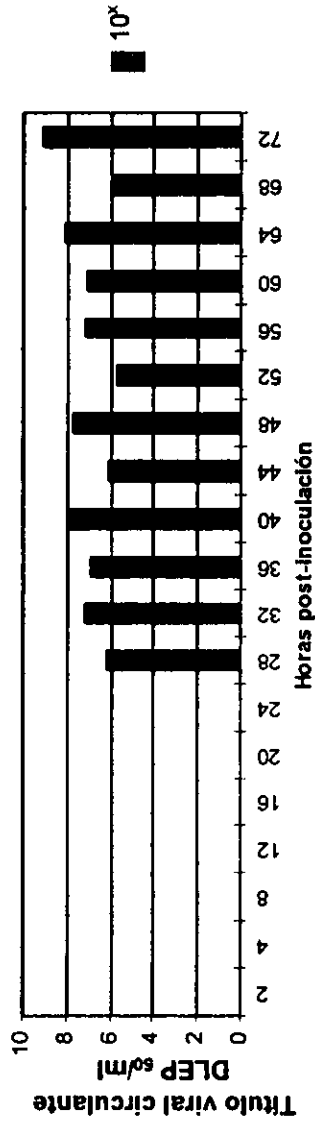
**Figura 12.-** Media histológica de lesiones en la cresta de aves susceptibles y de aves inmunizadas después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.



A Aves inmunizadas con una vacuna inactivada emulsionada en aceite y expuestas al virus 21 días post-vacunación.

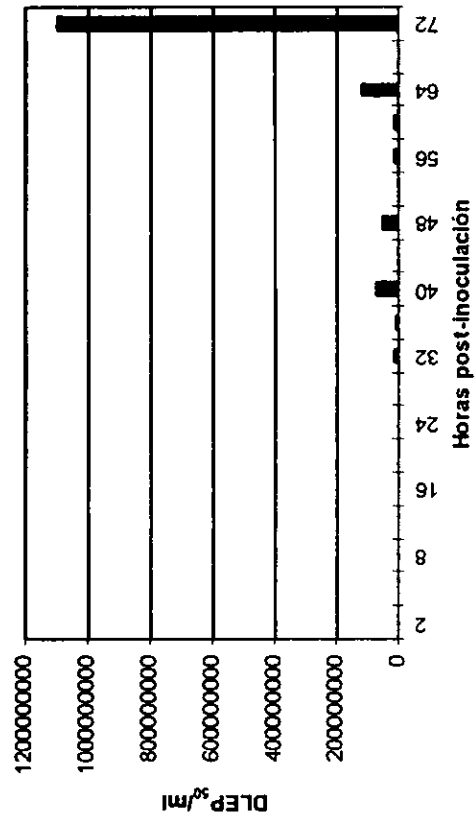
B MHL = media histológica de lesiones. Las lesiones se calificaron con un método numérico de acuerdo a su severidad (1 = leve, 2 = moderada, 3 = severa), extensión (1 = pequeña, 2 = moderada, 3 = amplia) y cantidad (1 = escasa, 2 = moderada, 3 = abundante). La MHL se calculó al sumar las calificaciones correspondientes a las lesiones de las tres aves y dividirlo entre tres.

**Figura 13.-** Comportamiento de los títulos virales circulantes en la sangre de aves susceptibles después de la infección con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.



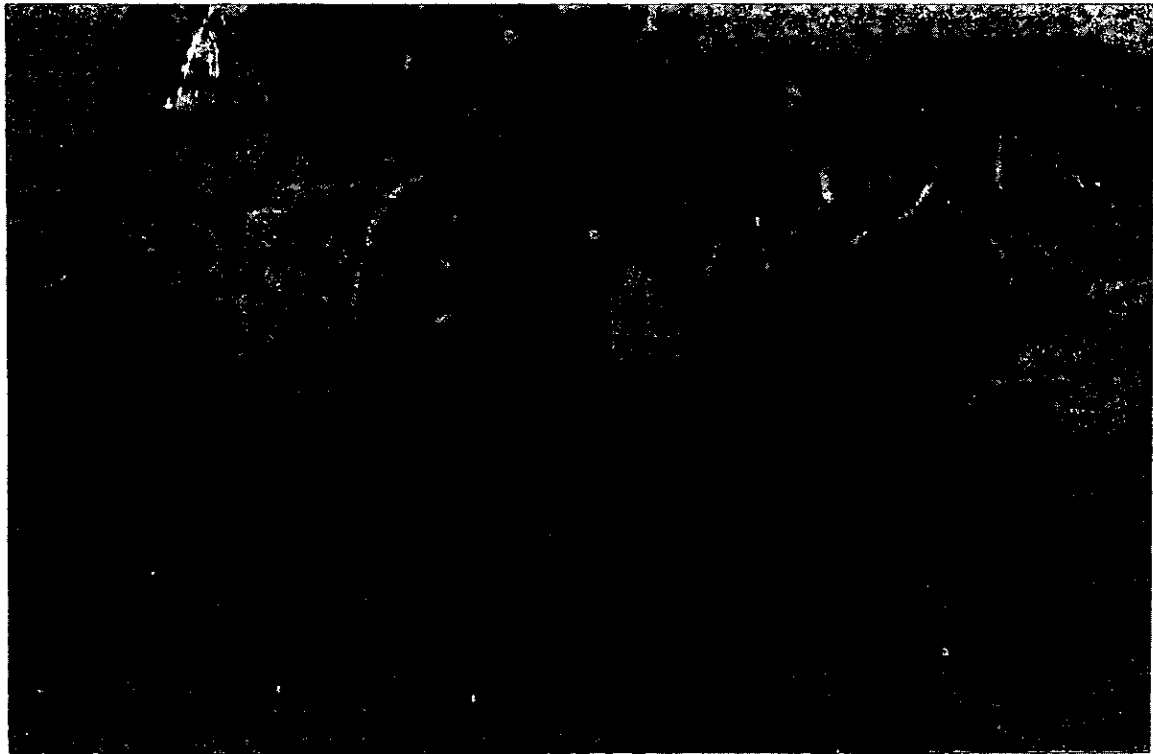
DLEP<sub>50</sub>/ml= Dosis letales embrión de pollo al 50% por mililitro.  
Cada punto en la gráfica representa el valor promedio de la mezcla de la sangre de tres aves diferentes.

**Figura 14.-** Cantidad de virus de influenza aviar circulante en la sangre de aves susceptibles después de la infección con el virus A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno.



DLEP<sub>50</sub>/ml= Dosis letales embrión de pollo al 50% por mililitro.  
Cada punto en la gráfica representa el valor promedio de la mezcla de la sangre de tres aves diferentes.

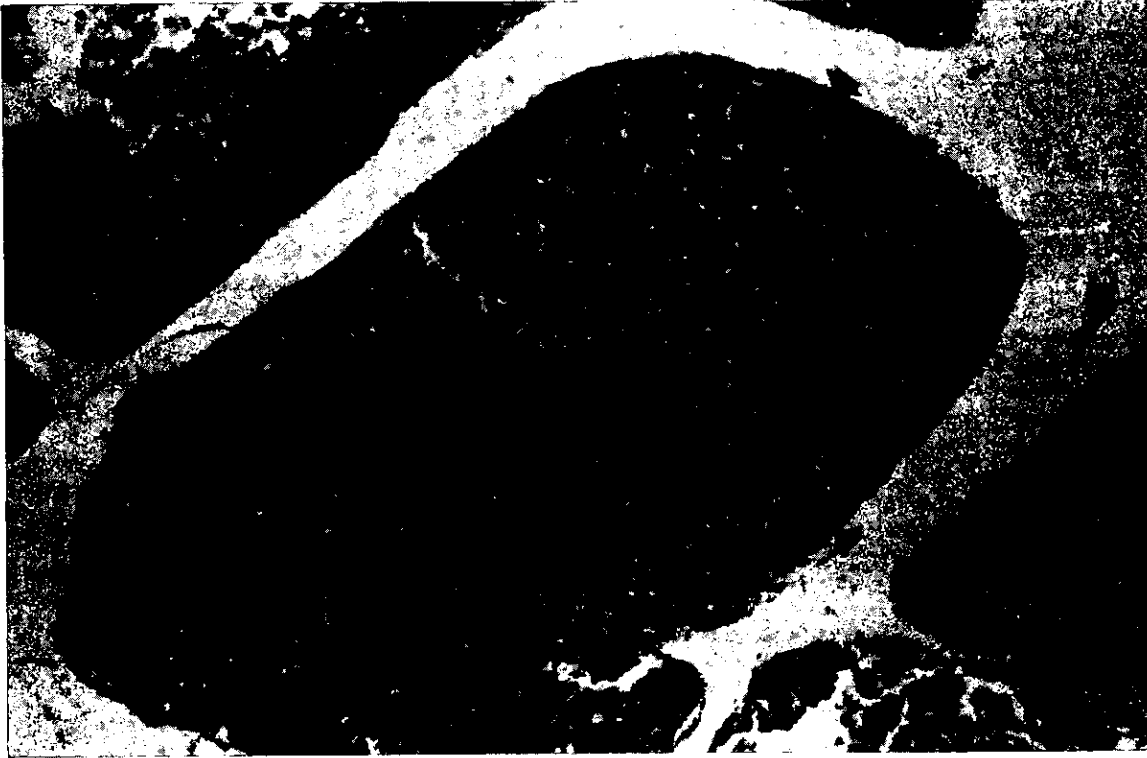




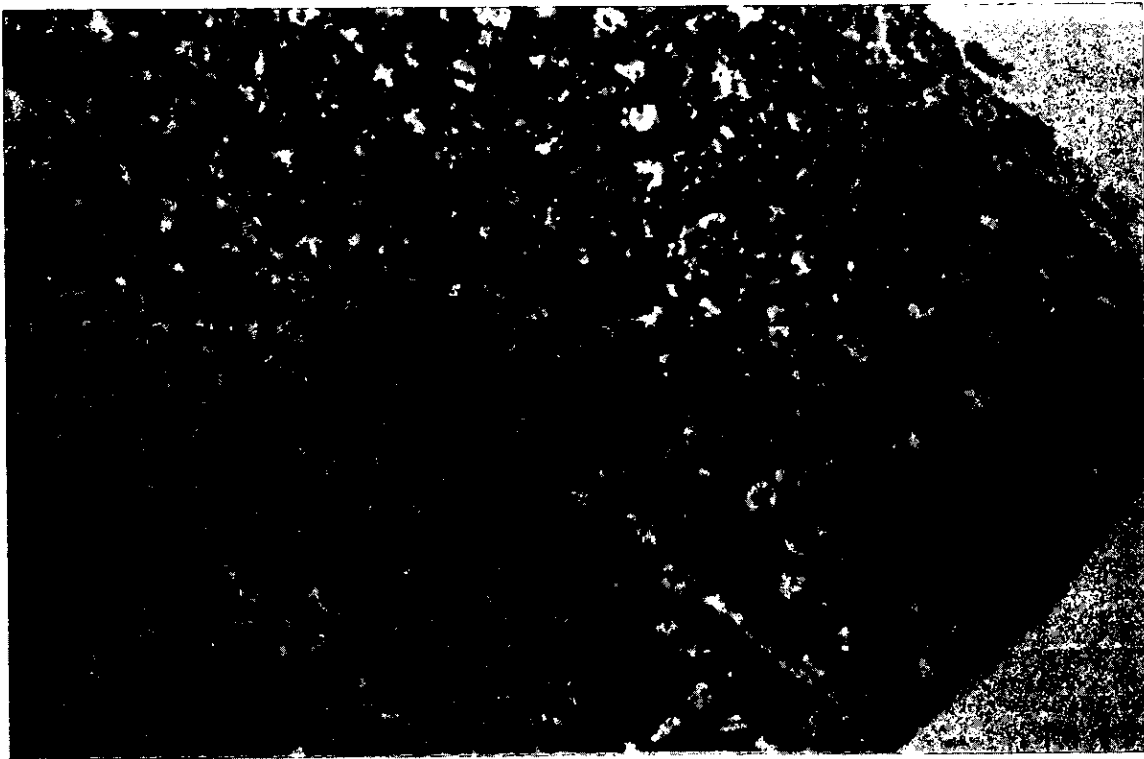
**Figura 15.-** Glándulas salivales palatinas de un ave susceptible 72 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Adenitis no supurativa severa con destrucción del parénquima glandular (flechas). H&E. 80X



**Figura 16.-** Glándulas salivales palatinas de un ave susceptible 72 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Adenitis no supurativa severa con abundante infiltración linfocitaria (flechas). H&E. 180X



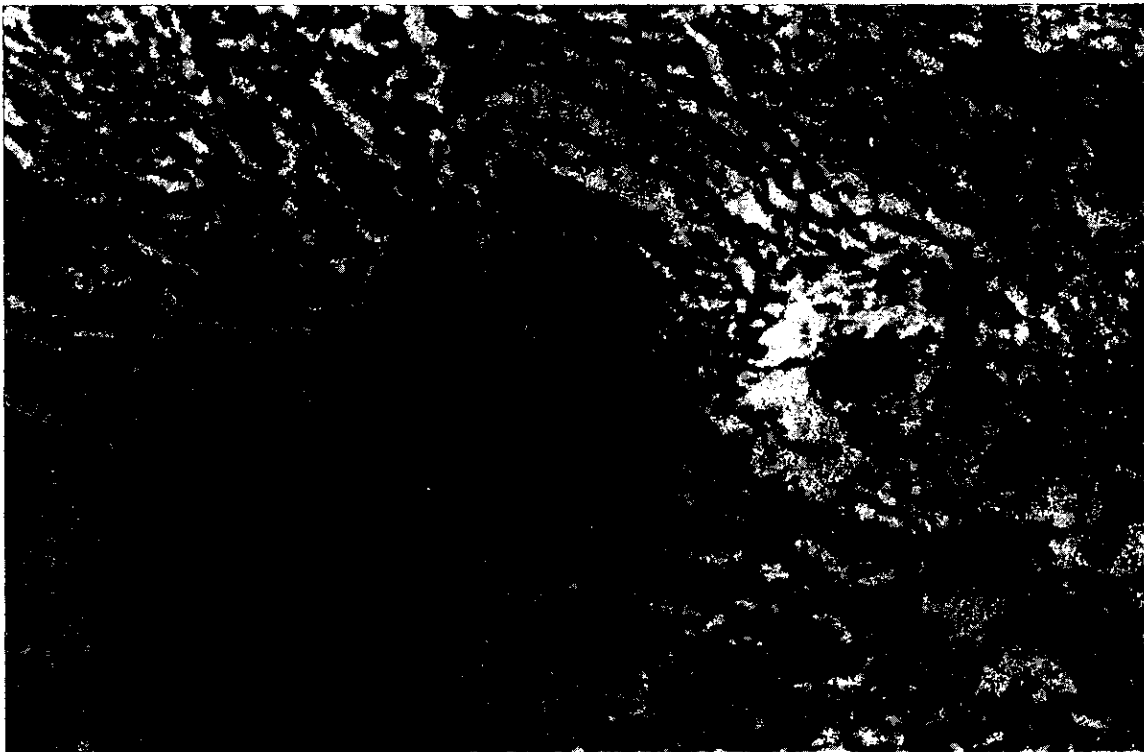
**Figura 17.-** Timo de un ave susceptible 56 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Apoptosis severa en zona cortical (flechas pequeñas). Despoblación linfoide severa en zona medular (flecha grande). H&E. 80X



**Figura 18.-** Timo de un ave susceptible 56 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Apoptosis severa en zona cortical (flechas pequeñas). Apoptosis y depleción linfoide severa en zona medular (flecha grande). H&E. 180X



**Figura 19.-** Cresta de un ave susceptible 36 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Focos de necrosis y vacuolización del epitelio en epidermis (flecha grande). Presencia de exudado seroso y leucocitos en dermis (flechas chicas). H&E. 80X



**Figura 20.-** Cresta de un ave susceptible 36 hpi con el virus de influenza aviar A/Chicken/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógeno. Arteriola sin cambios (flecha chica). Arteriola con formación de un trombo rodeada de exudado seroso y leucocitos del proceso inflamatorio (flecha grande). H&E. 720X